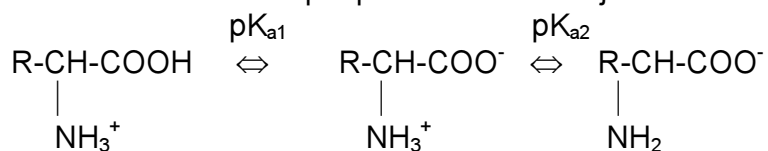


TEORIE A ZADÁNÍ ÚLOH

A. AMINOKYSELINY A BÍLKOVINY

Chování disociabilních skupin podstatně ovlivňuje vlastnosti aminokyselin a bílkovin:



Disociační konstanty jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka I: Disociační konstanty aminokyselin

AK	hodnota pKa		
	pK _{a1}	pK _{a2}	pK _a boční řetězec
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
Glu	2.2	9.7	4.3 -COOH
His	1.8	9.2	6.0 -imidazol
Cys	1.8	10.8	8.3 -SH
Tyr	2.2	9.1	10.9 -fenol
Lys	2.2	9.2	10.8 -NH ₃ ⁺
Arg	1.8	9.0	12.5 -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

Hodnota pH, při kterém je aminokyselina elektroneutrální.

$$N_2^+ = \frac{H \cdot C}{K_2 + H} \quad \text{kde } C \text{ je koncentrace aminokyseliny,}$$

$$H \text{ je koncentrace } H_3O^+ \text{ v izoelektrickém bodě}$$

$$C_1^- = \frac{K_1 \cdot C}{K_1 + H}$$

$$C_1^- = N_2^+$$

$$H^2 = K_1 K_2 \quad \mathbf{pI = 1/2 (pK_1 + pK_2)}$$

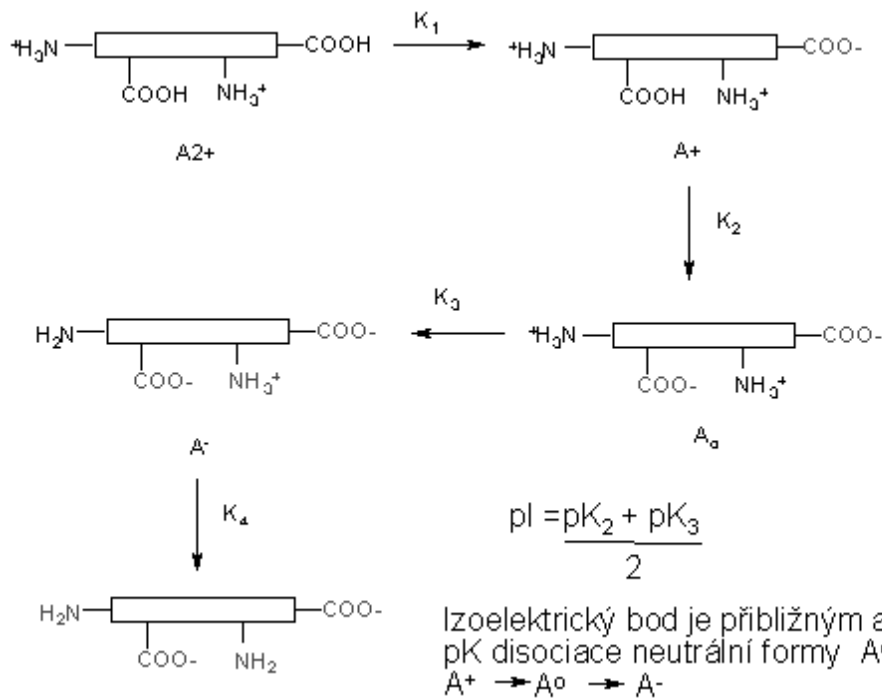
Izoelektrický bod je aritmetickým průměrem pKa kyselé a bazické skupiny.

Výpočet izoelektrického bodu pro bazickou aminokyselinu: $pI = 1/2 (pK_2 + pK_3)$
(pI bazické aminokyseliny je průměrem pKa obou bazických skupin)

Výpočet izoelektrického bodu pro kyselou aminokyselinu: $pI = 1/2 (pK_1 + pK_3)$
(pI kyselé aminokyseliny je průměrem pKa obou kyselých skupin)

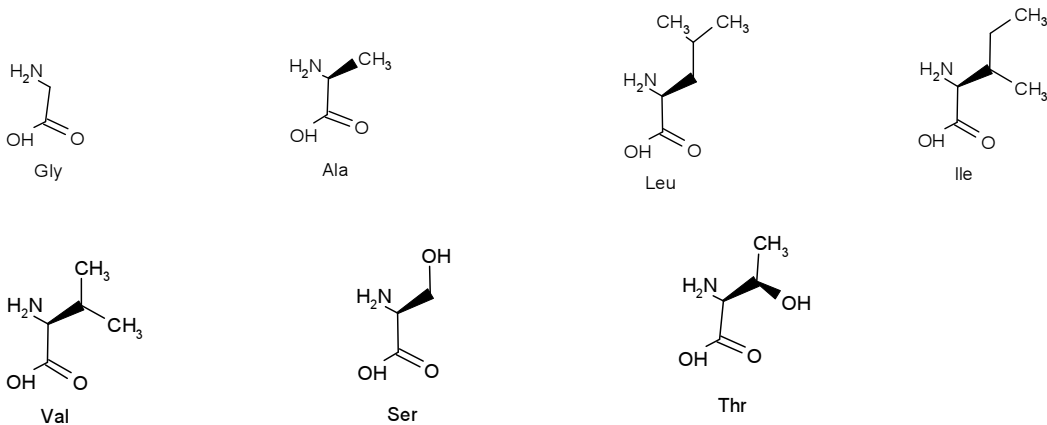
Výpočet izoelektrického bodu pro Tyr a Cys ($K_3 \approx 10^{-9}$): $pI = -1/2 \log(K_1 \cdot K_2 + K_1 \cdot K_3)$

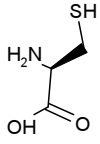
Disociační rovnováhy aminokyselin a peptidů s několika disociabilními skupinami:



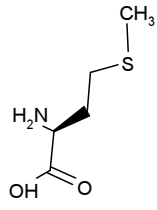
Peptidy zapisujeme od N-konce k C-konci.

Nejdůležitější L-aminokyseliny

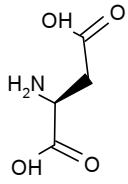




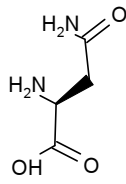
Cys



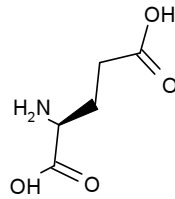
Met



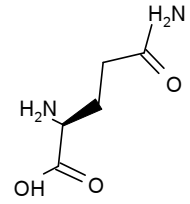
Asp



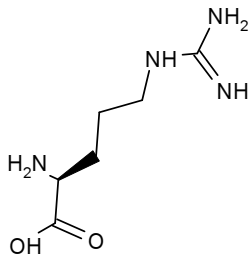
Asn



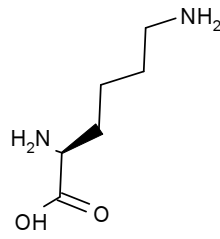
Glu



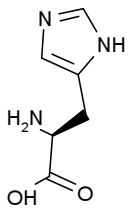
Gln



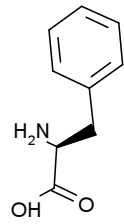
Arg



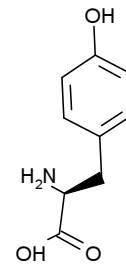
Lys



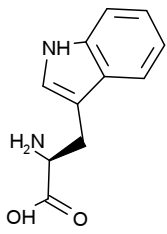
His



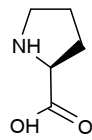
Phe



Tyr



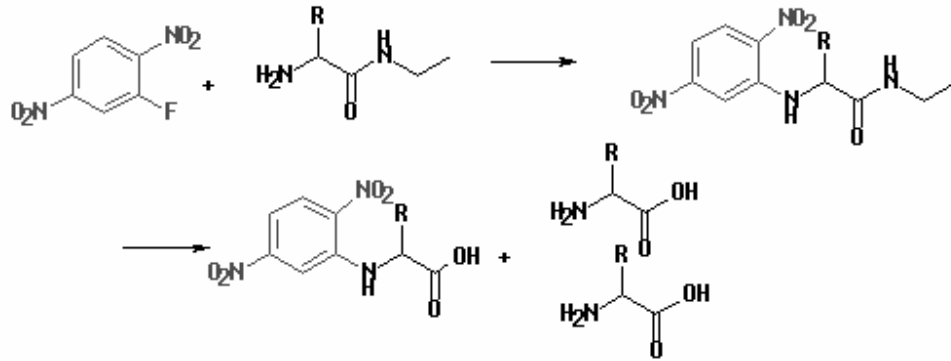
Try



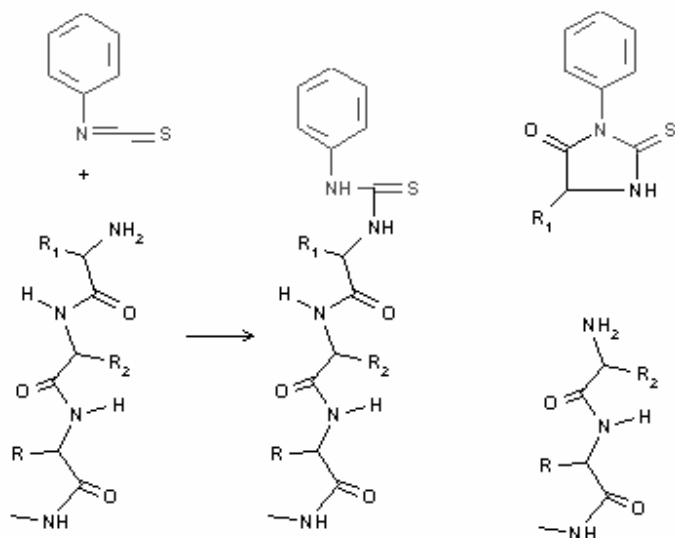
Pro

Stanovení primární struktury bílkovin

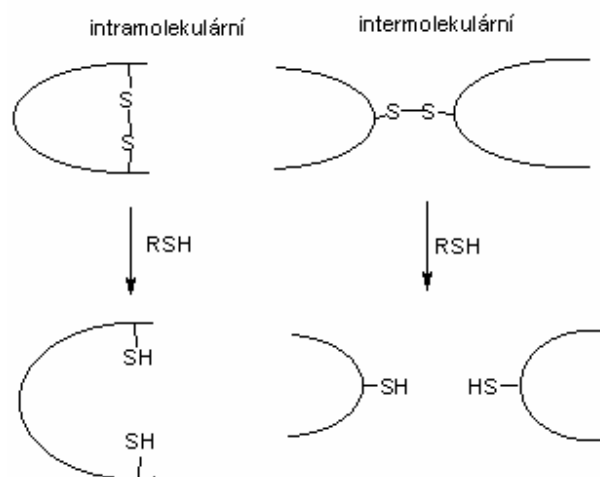
Sangerovo činidlo



Edmanovo odbourávání



Redukce disulfidických můstků merkaptoethanolem



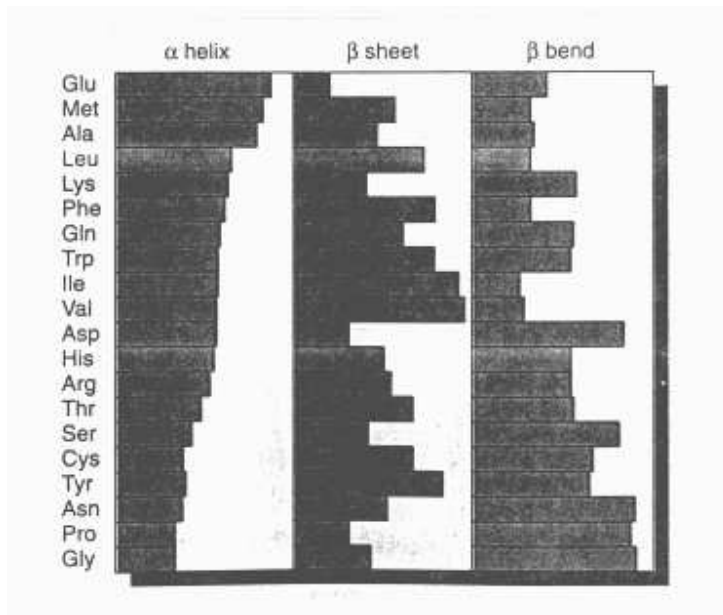
Specifita enzymů a reagens hydrolyzujících peptidové vazby

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

Sekundární struktura bílkovin

Sekundární struktura bílkovin je důsledkem její primární struktury.

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



α -šroubovice

0,54 nm na 1 závit

0,15 nm mezi dvěma aminokyselinovými zbytky

β -skládaný list

0,36 nm mezi dvěma aminokyselinovými zbytky

1. Napište vzorce aminokyselin

a) majících aromatické jádro

b) obsahujících síru

c) majících při pH 7 celkový kladný náboj

d) majících při pH 7 celkový záporný náboj

e) majících alifatický řetězec

f) která aminokyselina nemá žádný asymetrický uhlíkový atom a která má dva asymetrické atomy?

2. Zakreslete titrační křivku a popište inflexní bod

a) slabé kyseliny (kys. octové)

b) 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, Vypočítejte izoelektrický bod:

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 skupin viz př.4

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 mol.l^{-1} HCl. Napište, které aminokyseliny se pravděpodobně zachytí a které z kolony vytečou.

Poté byla kolona promývána puřrem 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 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: NH₂-Ala-Glu-Gly-Tyr-Lys-COOH (I)

NH₂-Gly-Asp-His-Tyr-Lys-COOH (II)

b) na sloupci anexu: NH₂.Ser.Tyr.Met.Glu.His.Phe.Arg.Gly.COOH (III)

NH₂.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 (Dowex 50) 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 LiBH₄ dává CH₂(NH₂)CH₂OH 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-dinitrofluorbenzenu.

NH₂-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 pokytně 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.

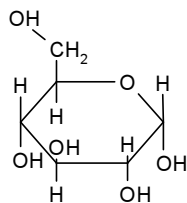
28. Následující látky jsou velmi často používány při studiu bílkovin :

- 1/ CNBr
- 2/ močovina
- 3/ merkaptoethanol
- 4/ karboxypeptidáza
- 5/ 6 N HCl
- 6/ ninhydrin
- 7/ 2,4-dinitrofluorbenzen

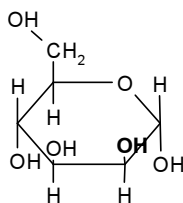
- a) Která z nich se používá označení NH₂ konce bílkoviny?
- b) Která by byla použita pro štěpení peptidické vazby na karboxylovém konci methioninu?
- c) Která by byla použita pro štěpení intermolekulárních nebo intramolekulárních disulfidických můstků?
- d) Která látka se používá pro potlačení vodíkových vazeb?

B. CUKRY

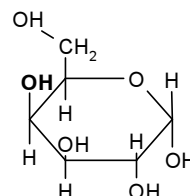
Nejdůležitější D-sacharidy:



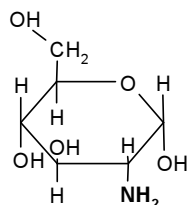
α -D-glukopyranosa



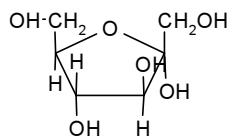
α -D-mannopyranosa



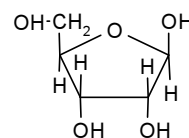
α -D-galaktopyranosa



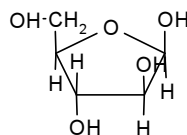
α -D-glukosamin



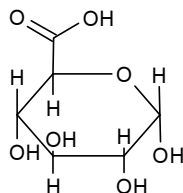
α -D-fruktofuranosa



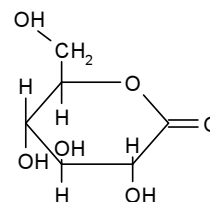
β -D-ribofuranosa



β -D-arabinofuranosa



kys. α -D-glukuronová



kys. D-glukonová

- Nejjednodušší ketosa je a) trehalosa b) fruktosa
c) erythrolusa d) dihydroxyaceton
- Ketosy mají poloacetalový hydroxyl na uhlíku č.
a) 1 b) 2 c) 3 d) 6
- Mutarotace je důsledkem přeměny
a) aldosa na ketosu nebo naopak
b) hexosa na pentosu "
c) formy D- na L- "
d) formy α - na β -
- Napište vzorce následujících disacharidů:

- a) 4-O- α -D-glukopyranosyl-D-glukosa
- b) 4-O- β -D-galaktopyranosyl-D-glukosa
- c) α -D-mannopyranosyl- α -D-glukopyranosid
- d) 4-O- β -D-mannopyranosyl-D-galaktosa
- e) β -D-galaktopyranosyl- β -D-glukopyranosid

5. Která OH skupina glukosy je nejreaktivnější

Napište vzorec reakčního produktu D-glukosy s methanolem v kyselém prostředí. Napište vzorec produktu reakce galaktosy se silnými alkylačními činidly (CH_3I , dimethylsulfát). Tento produkt byl dále podroben mírné kyselé hydrolyze. Napište vzorec výsledné látky.

6. Napište vzorec produktu redukce D-glukosy amalgámem sodíku. Napište vzorec produktu oxidace D-mannosy slabými oxidačními činidly (NaIO) a silnými oxidačními činidly (HNO_3).

7. Laktosa byla methylována pomocí dimethylsulfátu a poté hydrolyzována zředěnou HCl . Napište vzorce produktů.

8. Kyselá hydrolyza trisacharidu dává D-glukosu a D-galaktosu v poměru koncentrací 2:1. Úplná methylace trisacharidu a následná hydrolyza dává tyto produkty:

- 2,3,6-tri-O-methyl-D-galaktosa
- 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glukosa
- 2,3,4-tri-O-methyl-D-glukosa

Napište vzorec trisacharidu (jsou možné dvě varianty).

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

10. 6-O- α -D-galaktopyranosyl-D-glukosa 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-methylgalaktosa
 - 2,3-di-O-methylribosa
- 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-D-fruktosa
- 2,3,4,6-tetra-O-metyl-D-galaktosa

Napište vzorec tohoto disacharidu.

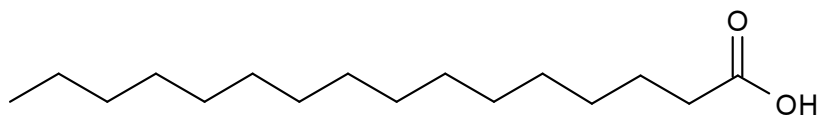
- b) kys. 2,3,4-tri-O-methylmannuronová
2,3,4,6 tetra-O-methylglukosa

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

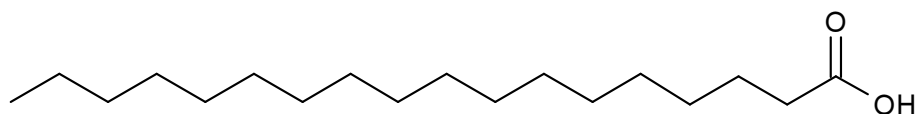
13. Napište vzorec: 3-O- β -D-mannopyranosyl-D-fruktosy. Tento disacharid byl metylván pomocí metyljodidu a hydrolyzován v slabé HCl. Napište vzorec produktu.

C. LIPIDY

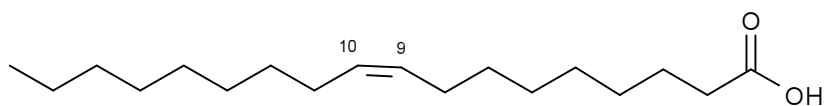
Nejdůležitější přirozené mastné kyseliny:



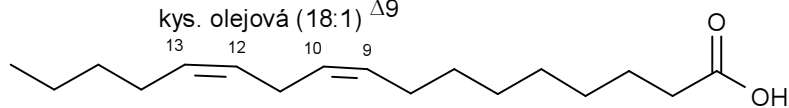
kys. palmitová



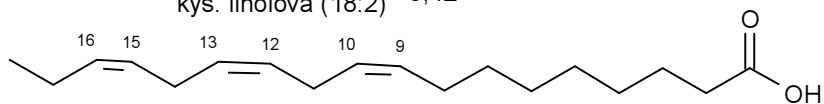
kys. stearová



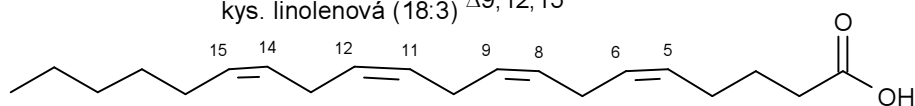
kys. olejová (18:1) Δ^9



kys. linolová (18:2) $\Delta^9,12$

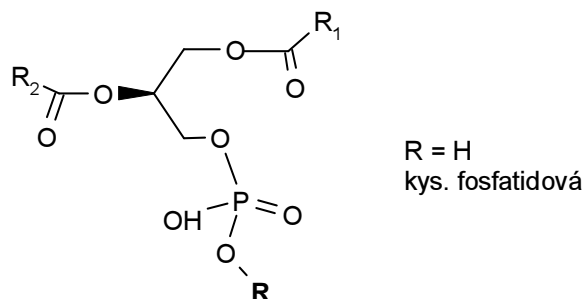


kys. linolenová (18:3) $\Delta^9,12,15$

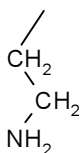


kys. arachidonová (20:4) $\Delta^5,8,11,14$

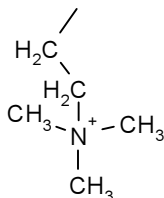
Fosfolipidy:



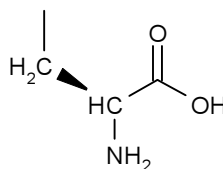
R =



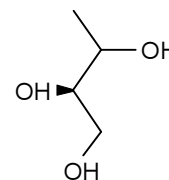
ethanolamin



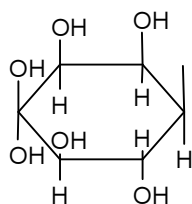
cholin



serin



glycerol



myoinositol

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

kys. olejová (18:1⁹), kys. linolová (18:2^{9,12})
 kys. palmitolejová (16:1⁹) kys. linolenová (18:3^{9,12,15})

4. Napište vzorce těchto fosfolipidů:

- kys. dipalmitoylfosfatidová
- 1-palmitoyl-2-oleylfosfatidylcholin
- dipalmitoylfosfatidylethanolamin
- 1-stearoyl-2-palmitoylfosfatidylglycerol
- dioleoylfosfatidylserin
- 1-stearoyl-2-linoleoylfosfatidylserinu.
(kys. linolová 18:2 $\Delta^{9,12}$.)
- napište vzorec 1-palmitoyl-2-oleylfosfatidylglycerolu.
(kys. olejová 18:1 Δ^9 .)

Jaký bude jeho celkový náboj při pH 7.5 (pKa fosfátu = 6.8, kys.fosforečná: pK₁=2.2, pK₂=7,2, pK₃=12,3, serin: pK_{a1}=2.1, pK_{a2}=9.2).

5. Napište vzorec cholesterolu a očísľujte jej.

6. Fosfolipidy jsou důležitými složkami biomembrán, kterým udělují 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:

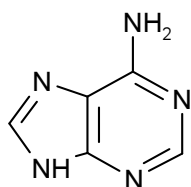
- dipalmitoylfosfatidylcholinu
- 1-palmitoyl-2-stearoylfosfatidylcholinu
- distearoylfosfatidylethanolaminu

Použijte těchto údajů:

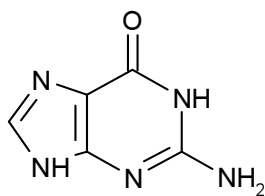
- Selektivního odštěpení acylu v poloze 1 lze dosáhnout fosfolipázou A₁, v poloze 2 fosfolipázou A₂.
- Chemicky lze obě mastné kyseliny odštěpit mírnou alkalickou hydrolyzou za katalýzy tetrabutylamonium hydroxidem.
- Acylace glycerolu se provádí příslušnými acylchloridy.
- Hydrolyzu vazby mezi fosfátem a bazí katalyzuje fosfolipasa D. Rovnovážná konstanta této reakce je rovna 1.

D NUKLEOVÉ KYSELINY

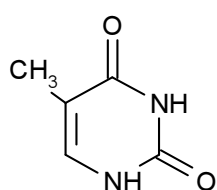
Nukleové baze



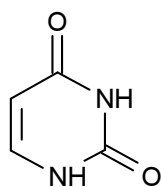
Adenin



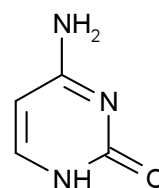
Guanin



Thymin

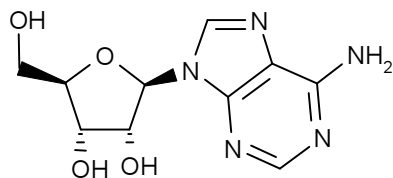


Uracil

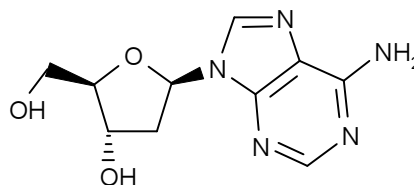


Cytosin

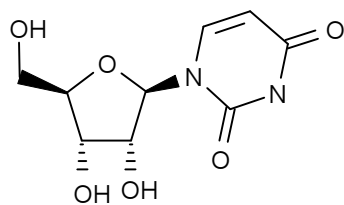
Nukleosidy



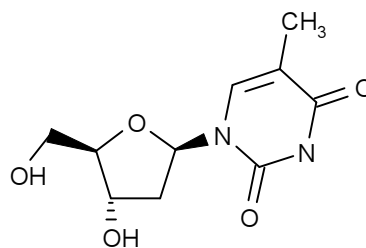
Adenosin



Deoxyadenosin

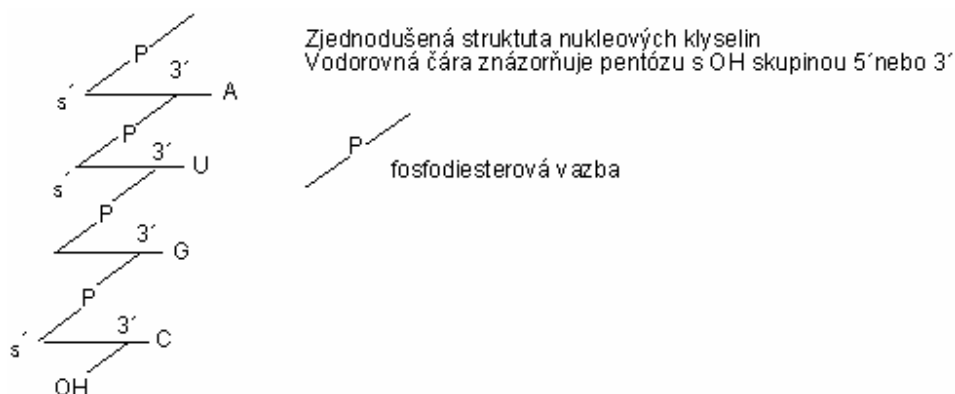


Uridin



Deoxythymidin

Primární struktura nukleových kyselin



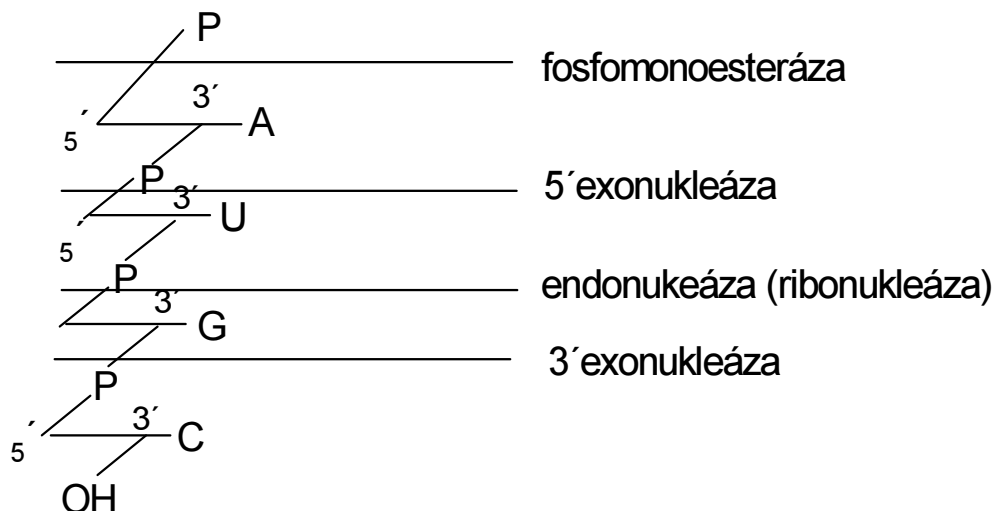
Metody stanovení sekvence nukleových kyselin:

Enzymy hydrolyzující nukleové kyseliny 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 (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 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 fragmenů za denaturačních podmínek (rychlost 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 sousední bazemi je 0,23 nm.

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

Genetický kód mRNA prokaryotů:

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 absorpční $A_{260} = 0.652$ 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 hydrolýzy této RNA pomocí následujících enzymů:

- a) fosfomonoesteráza
- b) fosfodiesteráza hadího jedu (3'- exonukleáza)

- c) fosfodiesteráza ze sleziny (5' - exonukleáza)
 d) ribonukleáza T1 (hydrolýza v místě G, vznik 3'P oligonukleotidu)
 e) 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

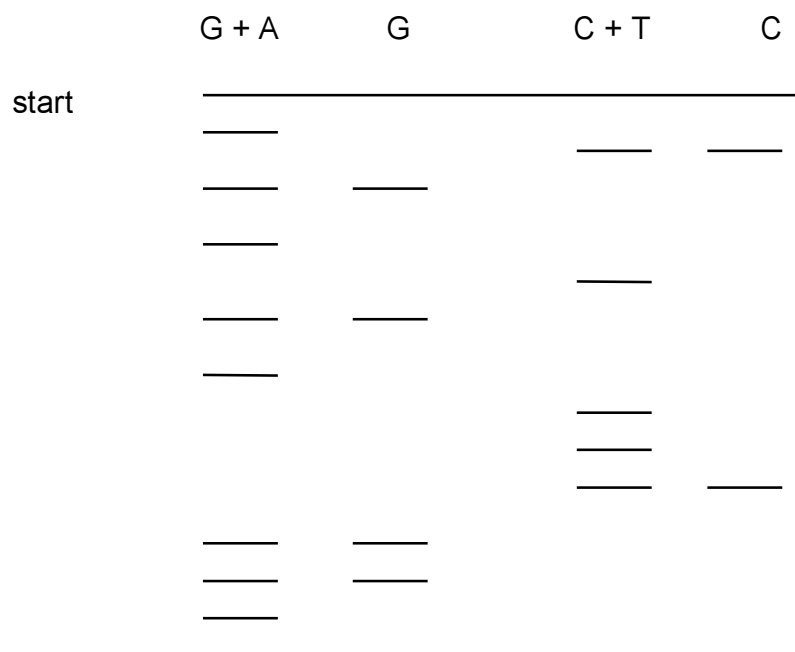
5' terminální nukleotid byl označen ^{32}P . Jaké oligonukleotidy získáme po působení fosfodiesterázy hadího jedu (viz výše). Které z nich budou značeny ^{32}P ? Které oligonukleotidy získáme hydrolýzou pomocí desoxyribonukleázy II a které z nich budou značeny ^{32}P (desoxyribonukleáza II je endonukleáza 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 získáme C, dinukleotid obsahující A a C a dále trinukleotid obsahující A, G a U.
 (penkreatická 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 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, 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 RNA polymerázou: 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.

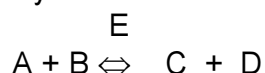
20. Při pokusu byla enzymově připravena glutaminyl-tRNA značená na glutaminu. Poté byla tato látka chemicky desaminována za vzniku glutamyl-tRNA. Tato tRNA byla přidána do bezbuněčné směsi připravené z *E. coli* a zbavené mRNA. Ke směsi byl přidán uměle připravený polymer obsahující ekvimolární koncentraci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

E. TERMODYNAMIKA ENZYMOVÝCH REAKCÍ

Základní vztahy:



$$\Delta G = \Delta G_o + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad R=8.31 \text{ J.deg}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

povaha reakce aktuální koncentrace

$$\Delta G_o = -RT \ln K_{eq}$$

Tab.II Hodnoty ΔG_o hydrolýzy důležitých vazeb

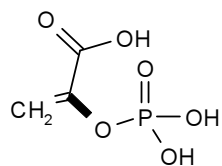
	ΔG_o (kJ.mol ⁻¹)
fosfoenolpyruvát ⇌ pyruvát	-61.8
karbamoylfosfát ⇌ karbamát	-51.4
acetylfosfát ⇌ k.octová	-43.0
kreatinfosfát ⇌ kreatin	-43.0
difosfát ⇌ fosfát	-33.4
acetylKoA ⇌ acetát	-31.3
ATP ⇌ ADP	-30,5
ADP ⇌ AMP	-30.5
glukosa-1-P ⇌ glukosa	-20.9

Glukosa-6-P	↔ glukosa	-12.5
glycerol-3-P	↔ glycerol	-8.4

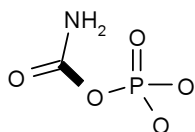
1. Vypočítejte ΔG_0 reakce přeměny dihydroxyacetonfosfátu na glyceraldehydfosfát, je-li $K_{eq} = 0.0475$ při 25°C . Vypočítejte ΔG reakce, je-li koncentrace dihydroxy AP $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ a glyceraldehyd P $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.

2. Vypočítejte ΔG hydrolýzy ATP na ADP a P_i , jsou-li koncentrace ADP a ATP ekvimolární a koncentrace fosfátu: a) 1 mol.l^{-1} , b) 0.001 mol.l^{-1} . Jaká je ΔG hydrolýzy za aktuálních podmínek hydrolýzy ve svalu, kde je koncentrace ATP = 5 mmol.l^{-1} , ADP = 0.5 mmol.l^{-1} , $\text{P}_i = 1 \text{ mmol.l}^{-1}$ při 25°C .

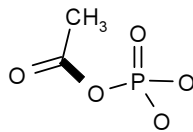
Vzorce některých energeticky významných sloučenin:



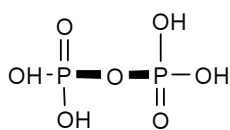
Fosfoenolpyruvát



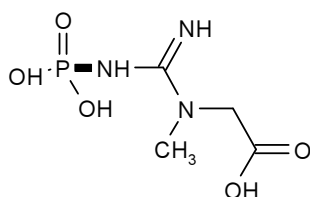
Karbamoylfosfát



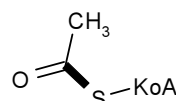
Acetylfosfát



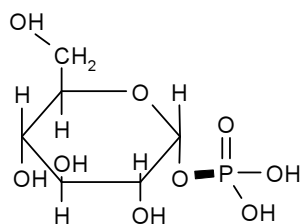
Difosfát



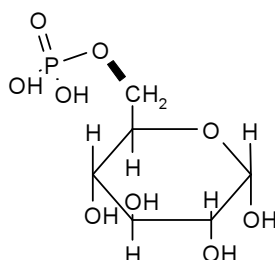
Kreatinfosfát



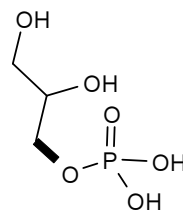
Acetyl-KoA



Glukosa-1-fosfát



Glukosa-6-fosfát



Glycerolfosfát

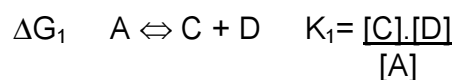
3. Vypočítejte ΔG hydrolýzy difosfátu na fosfát, je-li aktuální koncentrace difosfátu 1 mmol.l^{-1} , koncentrace fosfátu 150 mmol.l^{-1} . ΔG_0 reakce je $-33.4 \text{ kJ.mol}^{-1}$, teplota 25°C . Vypočítejte rovnovážnou konstantu reakce.

4. Jaká musí být koncentrace malátu, aby reakce:

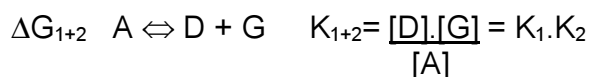


byla v rovnováze. Koncentrace fumarátu je 1 mmol.l^{-1} , ΔG_0 reakce je $+3.1 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $T = 25^\circ\text{C}$.

Spřažené reakce:



[C]

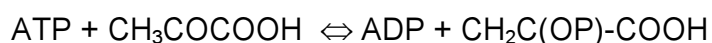


$$\Delta G_{01+2} = -RT \ln K_{1+2} = -RT(\ln K_1 + \ln K_2)$$

$$\Delta G_{01+2} = \Delta G_{01} + \Delta G_{02}$$

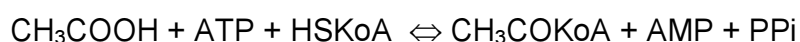
$$\Delta G_{1+2} = \Delta G_{01+2} + RT \ln \frac{[D].[G]}{[A]}$$

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



Jaký je rovnovážný poměr koncentrací pyr/PEP, je-li poměr ATP/ADP=10.

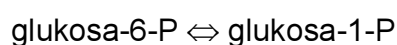
6. Tvorba acetyl-KoA probíhá v přítomnosti ATP:



(PPi je difosfát).

Vypočítejte ΔG_o reakce (předpokládejte, že ΔG_o hydrolýzy ATP \Leftrightarrow AMP + PPi je stejné jako při vzniku ADP a Pi. PPi je hydrolyzován pyrofosfatázou. Vypočítejte celkové ΔG_o reakce při 25°C. Jaký je vliv hydrolýzy difosfátu?

7. Vypočítejte ΔG_o izomerace:



Jaký je rovnovážný poměr koncentrace obou látek při 25°C. Jaké je ΔG reakce, je-li koncentrace glukosa-6-P 10 mmol.l⁻¹ a koncentrace glukosa-1-P 2 mmol.l⁻¹?

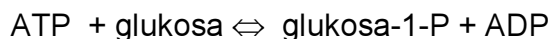
8. Kreatinfosfát je hlavní zásobní látkou svalů. Jaké je ΔG_o reakce:



Jaký je rovnovážný poměr kreatin-P/kreatin při 25°C, jsou-li koncentrace ADP a ATP ekvimolární. Napište vzorec kreatinfosfátu.

9. Koncentrace glukosy v buňce je 1 mmol.l⁻¹, koncentrace glukosa-1-P 0.05 mmol.l⁻¹.

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

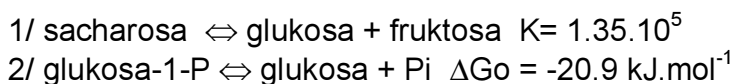


byla při 25°C v rovnováze.

10. Vypočítejte ΔG_0 reakce při 25°C:



K dispozici máte tyto údaje:



Jaká bude volná energie reakce ΔG za aktuálních podmínek:

Koncentrace Pi 1 mmol.l⁻¹, sacharosa 0.5 mmol.l⁻¹, glukosa-1-P a fruktosa 4 mmol.l⁻¹.

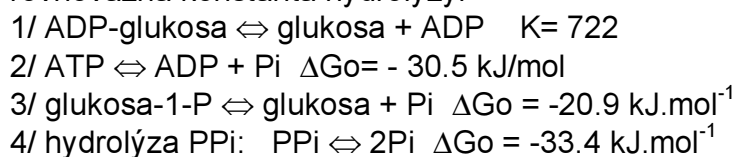
Je možno glykosidovou vazbu sacharosy počítat mezi makroergickou vazbu, pokud mezi makroergické vazby počítáme vazby se standardní volnou energií hydrolyzy nižší než -10 kJ.mol⁻¹?

11. Vypočítejte stand. volnou energii tvorby aktivované glukosy při 25°C:



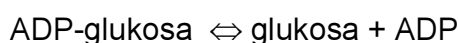
K dispozici máte tyto údaje:

rovnovážná konstanta hydrolyzy:



Vypočítejte ΔG hydrolyzy difosfátu za aktuálních podmínek koncentrace při 25°C: Pi = 5 mmol/l, PPi = 2 mmol.l⁻¹.

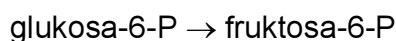
12. Vypočítejte stand. volnou energii hydrolysy aktivované glukosy při 25°C:



K dispozici máte tyto údaje:

- 1/ Glukosa-1-P + ATP \Leftrightarrow ADP-glukosa + PPi $K = 2$
 2/ hydrolýza difosfátu: PPi \Leftrightarrow 2Pi $\Delta G_0 = -33.4 \text{ kJ.mol}^{-1}$
 3/ Glukosa-1-P \Leftrightarrow glukosa + Pi $\Delta G_0 = -20.9 \text{ kJ.mol}^{-1}$
 4/ ATP \Leftrightarrow ADP + Pi $\Delta G_0 = -30.5 \text{ kJ.mol}^{-1}$

13. Dokažte výpočtem, zda bude probíhat tato reakce:



je-li $\Delta G_0 = +1,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$ a koncentrace fruktosa-6-P 10 mmol.l^{-1} při 25°C , koncentrace glukosa-1-P je 1 mmol.l^{-1} . Napišťe vzorce glukosa-1-P a fruktosa-1-P.

14. a) Jedním ze způsobů jak může svalová buňka zvýšit koncentraci ATP je následující reakce:



Vypočítejte, zda je tato reakce za standardních podmínek exergonická nebo endergonická, pokud předpokládáte, že ΔG_0 hydrolýzy u dvou fosfátových vazeb nukleotidu je stejná -30 kJ.mol^{-1} .

b) Jak by tomu bylo v případě, kdyby ΔG_0 fosfátu č.2 byla -28 kJ.mol^{-1} ? Vypočítejte hodnotu ΔG výše uvedené reakce za aktuálních koncentrací:

ATP $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$, ADP 1 mmol.l^{-1} , AMP $0,05 \text{ mmol.l}^{-1}$.

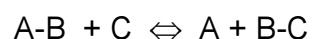
F ENZYMY

Hlavní skupiny enzymů podle typu reakce:

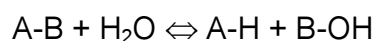
1. Oxidoreduktasy



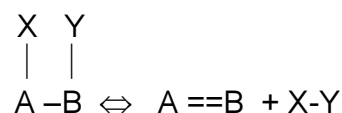
2. Transferasy



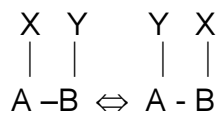
3. Hydrolasy



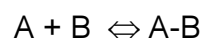
4. Lyasy (synthasy)



5. Izomerasy



6. Ligasy (synthetasy)



SYSTEMATICKÉ NAZVOSLOVÍ ENZYMŮ

1. Oxidoreduktasy

donor:akceptor-oxidoreduktasa

(např. glukosa:O₂-oxidoreduktasa, triviálně glukosaoxidasa)

2. Transferasy

donor:akceptor-skupinatransferasa

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

3. Hydrolasy

substrát-skupinahydrolasa

(např. protein-amidohydrolasa, triviálně proteinasa)

4. Lyasy (synthasy)

substrát-skupinalyasa

(např. citrát-oxalacetátlyasa, triviálně citrát-synthasa)

5. Isomerasy

neujasněné 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)

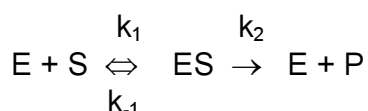
mutasa (chorismátmutasa)

6. Ligasy (syntetasy)

substrát: substrát-ligasa (tvořící nukleotid)

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

KINETIKA ENZYMOVÝCH REAKCÍ



$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{Michaelisova konstanta}$$

Je-li $k_2 \ll k_{-1}$, pak $K_m = \frac{k_{-1}}{k_1}$ Disociační konstanta komplexu ES

$$v_o = k_2[ES]$$

$$v_o = \frac{V \cdot S}{K_m + S} \quad \text{Rovnice Michaelise-Mentenové}$$

Platí-li, že $S \rightarrow \infty$,

pak $[E_t] = [ES]$

$$v_o = k_2[E_t] = V \quad \text{Limitní počáteční rychlost}$$

Limitní počáteční rychlost je tedy přímo úměrná koncentraci enzymu.

Pomocí této limitní rychlosti ($S \rightarrow \infty$, T, pH optimum) lze měřit množství enzymu, tzv. aktivitu.

Aktivita enzymu se udává v následujících jednotkách :

$$1 \text{ IU} = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$$

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

Číslo přeměny=katalytická aktivita=molekulová (resp.molární) aktivita enzymu=počet molekul (resp.molů) substrátu přeměněných za jednu sekundu jednou molekulou (resp.jedním molem) enzymu.

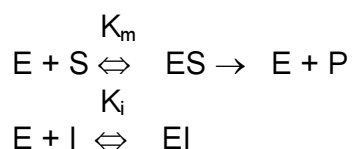
Stanovení K_m a V - linearizované vztahy:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V} \quad \text{Vynesení podle Lineweavera-Burka}$$

$$\frac{S}{v_o} = \frac{S}{V} + \frac{K_m}{V} \quad \text{Vynesení podle Hanese-Woolfa}$$

Enzymová inhibice

Inhibice kompetitivní:

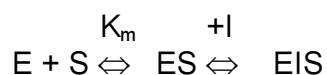
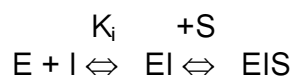


Jestliže $S \rightarrow \infty$, pak $EI \rightarrow 0$, a $v_o = V$
Linearizované vztahy:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V} \cdot (1 + i/K_i) \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V}$$

$$\frac{S}{v_o} = \frac{S}{V} + \frac{K_m(1 + i/K_i)}{V}$$

Inhibice nekompetitivní:



Linearizované vztahy:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V} \cdot (1 + i/K_i) \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V} \cdot (1 + i/K_i)$$

$$\frac{S}{v_o} = \frac{S}{V} (1 + i/K_i) + \frac{K_m}{V} (1 + i/K_i)$$

1. Enzymy v uzavřeném systému

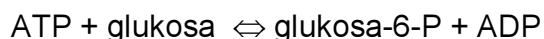
- a) posunují rovnováhu reakce ve směru tvorby produktu
- b) neovlivňují rovnovážný stav reakce
- c) zvyšují ΔG reakce
- d) snižují "

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

- a) oxalacetát + NADH + H⁺ → malát + NAD⁺
- b) glutamát + pyruvát → oxoglutarát + alanin
- c) škrob → (maltosa)n
- 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

3. Vysvětlete rozdíl mezi koenzymem a prostetickou skupinou. Vysvětlete roli koenzymu A v metabolismu, vysvětlete roli pyridoxalfosfátu.

4. Glukokinasa a hexokinasa jsou enzymy katalyzující tutéž reakci:



Glukokinasa z jater má K_m pro glukosu 10 mmol.l⁻¹, katalytická aktivita je 1.5 μmol.min⁻¹. Hexokinasa má K_m 0.1 mmol.l⁻¹, katalytická aktivita je 0.1 μmol.min⁻¹. Vypočítejte počáteční rychlost přeměny glukosy při její následující koncentraci (ATP je v nadbytku) a srovnajte hodnoty pro oba enzymy.

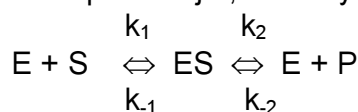
- a) 0.1 mmol.l⁻¹
- b) 1 mmol.l⁻¹
- c) 5 mmol.l⁻¹ normální hodnota
- d) 30 mmol.l⁻¹ diabetes

5. a) Aktivita enzymu v roztoku je $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$, Michaelisova konstanta enzymu pro daný substrát je $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vypočítejte jakou počáteční rychlostí bude enzymová reakce probíhat, je-li koncentrace substrátu $0.005 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

b) K enzymu byl přidán kompetitivní inhibitor o koncentraci $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $K_i = 0.2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jakou rychlostí bude reakce probíhat, bude-li koncentrace substrátu $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

c) K enzymu byl přidán nekompetitivní inhibitor o koncentraci $0.005 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jakou rychlostí bude reakce probíhat, budou-li reakční podmínky stejné jako v bodu b) ?

6. Předpokládejte, že enzym katalyzuje reakci:



kde $k_1 = 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-1} = 10^5 \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 10^2 \text{ s}^{-1}$, $k_{-2} = 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, a celková koncentrace enzymu $E_t = 0,1 \text{ nM}$. Vypočítejte následující hodnoty:

K_m , V_{\max} , katalytickou aktivitu (číslo přeměny), počáteční rychlost, je-li koncentrace substrátu $20 \mu\text{M}$

7. Na základě měření vypočítejte kinetické parametry enzymu, tj. K_m a maximální počáteční rychlost

konc. substrátu ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) v_o ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)

$0.3 \cdot 10^{-5}$	10.4
$0.5 \cdot 10^{-5}$	14.5
$1 \cdot 10^{-5}$	22.5
$3 \cdot 10^{-5}$	33.8
$9 \cdot 10^{-5}$	40.5

8. a) V přítomnosti inhibitoru o koncentraci $0.01 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byly naměřeny tyto počáteční rychlosti přeměny substrátu (viz úloha 7):

konc. substrátu ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) v_o ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)

$0.3 \cdot 10^{-5}$	3.96
$0.5 \cdot 10^{-5}$	5.75
$1 \cdot 10^{-5}$	8.70
$3 \cdot 10^{-5}$	13.00
$9 \cdot 10^{-5}$	15.80

Určete typ inhibice a vypočítejte K_i

b) V přítomnosti druhého inhibitoru 2 mmol.l^{-1} byly naměřeny tyto počáteční rychlosti:

konc. substrátu (mol.l^{-1})	v_0 ($\mu\text{mol.min}^{-1}$)
$0.3 \cdot 10^{-5}$	4.1
$0.5 \cdot 10^{-5}$	6.4
$1 \cdot 10^{-5}$	11.3
$3 \cdot 10^{-5}$	22.6
$9 \cdot 10^{-5}$	33.6

Vypočítejte K_i a určete typ inhibice.

9. Z následující údajů o enzymové reakci určete graficky případně početně typ inhibice, K_m enzymu a K_i .

koncentrace substrátu mmol.l^{-1}	v_0 (nkat)	
	bez inhibitoru	inhibitor (6 mmol.l^{-1})
2.0	139	88
3.0	179	121
4.0	213	149
10.0	313	257
15.0	370	313

Jak byste daný typ inhibice zrušili ?

10 a) Při kinetickém měření závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu byly zjištěny následující hodnoty:

S (mmol.l^{-1})	v_0 (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.

b) V přítomnosti koncentrace inhibitoru 1 mmol/l byly zjištěny tyto údaje:

Substrát (mmol.l^{-1})	V_0 (mmol.min^{-1})
-----------------------------------	----------------------------------

0,1	0,019
0,2	0,037
0,4	0,070
1,0	0,150
2,0	0,239

Určete, o jaký typ inhibice se jedná. Vypočítejte K_i inhibitoru.

11. Určete K_m a aktivitu enzymu na základě kinetických měření

S (mol.l ⁻¹)	Vo (μmol.min ⁻¹)
0.0003	0.026
0.001	0.054
0.002	0.070

V přítomnosti koncentrace inhibitoru 0.01 mmol.l⁻¹ byly naměřeny tyto hodnoty. Vypočítejte K_i a určete typ inhibice:

S (mmol.l ⁻¹)	Vo (μmol.min ⁻¹)
0.0003	0.011
0.001	0.023
0.002	0.030

12. Vypočítejte Michaelisovu konstantu a maximální rychlost reakce na základě kinetických měření:

substrátu (mol.l ⁻¹)	počáteční rychlost (nkat)
1.10 ⁻⁴	0,45
5.10 ⁻⁴	2,3
2.10 ⁻³	5,3
4.10 ⁻³	6,5

K enzymu byl přidán nekompetitivní inhibitor o koncentraci 4.10⁻⁴ mol.l⁻¹, K_i inhibitoru 1.10⁻³ mol.l⁻¹. Vypočítejte rychlost enzymové reakce, je-li koncentrace substrátu 2.10⁻³ mol.l⁻¹.

13. Aktivita enzymu v roztoku je 0.2 umol.min⁻¹, Michaelisova konstanta enzymu pro daný substrát je 0.2 mmol.l⁻¹.

a) Vypočítejte jakou počáteční rychlostí bude enzymová reakce probíhat, je-li koncentrace substrátu 0.005 mmol.l⁻¹.

b) K enzymu byl přidán kompetitivní inhibitor o koncentraci 0.1 mmol.l⁻¹, $K_i = 0.2$ mmol.l⁻¹. Jakou rychlostí bude reakce probíhat, bude-li koncentrace substrátu 20 mmol.l⁻¹.

c) K enzymu byl přidán nekompetitivní inhibitor o koncentraci 0.1 mmol.l^{-1} , $K_i = 0.2 \text{ mmol.l}^{-1}$. Jakou rychlostí bude reakce probíhat, bude-li koncentrace substrátu 20 mmol.l^{-1} .

14. Vypočítejte, jakou aktivitu ($\mu\text{mol/min}$) bude mít $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ mg}$ zcela čistého enzymu o molekulární hmotnosti $400\,000$, je-li molekulární aktivita (číslo přeměny 2500 sec^{-1}).

15. Vypočítejte molekulární aktivitu enzymu (číslo přeměny), jestliže $5 \cdot 10^{-4} \text{ mg}$ zcela čistého enzymu má aktivitu 20 mezinárodních jednotek. Molekulová hmotnost enzymu je $240\,000$.

16. K roztoku glutamátdehydrogenasy o aktivitě 5 nkat byl přidán glutamát a změřena počáteční rychlost reakce 1.5 nkat . Kolik procent enzymu je vázáno ve formě komplexu enzym-substrát? ($K_m = 2,25 \text{ mmol.l}^{-1}$).

17. Koncentraci jablečnanu ve vzorku by bylo možno stanovit pomocí příslušné dehydrogenasy citrátového cyklu na základě vznikajícího NADH:



Průběh reakce je závislý na pH prostředí. Rovnováha reakce je silně posunuta na levou stranu ($K = 5 \cdot 10^{-13} \text{ mol.l}^{-1}$). Vypočítejte, jaké pH pufru je nutno zvolit, aby alespoň 90% jablečnanu bylo přeměněno na oxalacetát. Reakční podmínky: počáteční koncentrace NAD = 5 mmol.l^{-1} , počáteční koncentrace jablečnanu $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$.

VÝSLEDKY ÚLOH

A.

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:

$\text{Arg}^{++}\text{-His}^+\text{-Gly}^0\text{-Phe}^0\text{-Gly}^0\text{-Glu}^{1-}\text{-Lys}^+\text{-Tyr}^0\text{-Cys}^0\text{-Ala}^{1-}$, celkem **2+**

při pH=9:

$\text{Arg}^{1,5+}\text{-His}^0\text{-Gly}^0\text{-Phe}^0\text{-Gly}^0\text{-Glu}^{1-}\text{-Lys}^+\text{-Tyr}^0\text{-Cys}^{1-}\text{-Ala}^{1-}$, celkem **0-1-**

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**

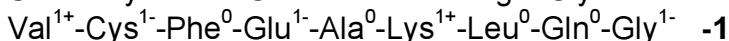
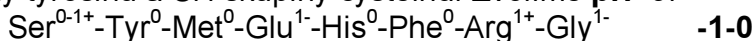
Gly¹⁺-Asp¹⁻-His¹⁺-Tyr⁰-Lys⁰ **1+**

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**:



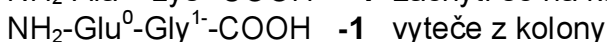
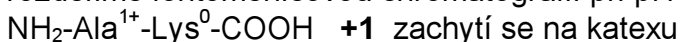
Pokud je pK blízké zvolenému pH, pak je přibližně polovina molekul v disociovaném stavu a druhá polovina v nedisociovaném stavu. Peptid s nábojem -1 až 0 nakonec vyteče, neboť se postupně naprotonují všechny aminoskupiny serinu. Peptid s nábojem -1 se na anexu zachytí.

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. NH₂-Val-Lys-Pro-Gly-COOH, popř. NH₂-Val-Lys-Gly-Pro-COOH

15. Po označení 2,4-dinitrofluorbenzenem a úplné hydrolýze 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 hydrolýzou 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 (NH₂-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 LiBH₄ (redukce -COOH skupiny na -CH₂OH), nebo hydrazinolýzy (všechny aminokyseliny se objeví ve výsledné směsi jako hydrazidy, kromě C-koncové aminokyseliny).

16. a) merkaptoethanol: B-S-S-C → B-SH + C-SH

b) N-konce: Asp, Leu

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

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

NH₂-Leu-?-Lys-Cys-Phe-Ala-COOH (Sangerova metoda)

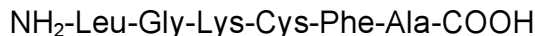
d) peptid C: aminokyseliny připadající v úvahu: Asp, Lys(?), Cys (určitě, S-S můstek), Gly(?), Glu(?), Met(?)...jedna z aminokyselin(?) bude součástí peptidu B

NH₂-Asp-?-?-?-?

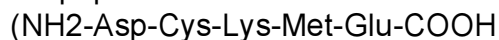
bromkyan: NH₂-Asp-?-?-Met-Glu-COOH

trypsin: NH₂-Asp-Cys-Lys-Met-Glu-COOH

peptid B je tedy:



struktura peptidu P:



SS

NH₂-Leu-Gly-Lys-Cys-Phe-Ala-COOH)

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-merkaptioethanolu:

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

NH₂-Asn-Cys-Phe-Thr-Lys-Lys-Trp-Cys-Arg-Ala-Val-Cys-COOH

NH₂-Cys-Thr-Pro-Tyr-Cys-Phe-Pro-Cys-COOH

19. N-konec: Thr

C-konec: Val-Ile-Leu-Lys-COOH

hydrolýza 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 -skládání 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 -skládání 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.

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-methylgalaktosa, 2,3,6-tri-O-methylglukosa

9. 2,4,6-tri-O-methyl-D-glukosa, 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-mannosa

10. 2,3,4-tri-O-methyl-D-glukosa, 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-galaktosa

11. 5-O-galaktosyl-D-ribosa

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-methylmannosa

C

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+ stearoylchlorid=1-palmitoyl-2-stearoylfosfatidylcholin

c) 1-palmitoyl-2-oleylfosfatidylcholin+ tetrabutylamonium hydroxid=

glycerolfosfocholin

glycerolfosfocholin+ stearoylchlorid=distearoylfosfatidylcholin

distearoylfosfatidylcholin+ fosfolipáza D=distearoylfosfatidová kyselina

distearoylfosfatidová kyselina+ethanolamin=distearoylfosfatidylethanolamin

D

2. $A_{260}=[AMP] \cdot \epsilon_{260}(AMP) + [GMP] \cdot \epsilon_{260}(GMP)$

$A_{280}=[AMP] \cdot \epsilon_{280}(AMP) + [GMP] \cdot \epsilon_{280}(GMP)$

$[GMP]=3,07 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$, $[AMP]=1,90 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$

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

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 dostáváme 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

E

1. +7,55 kJ/mol, -2,85 kJ/mol

2. a) -30,5 kJ/mol, b) -47,6 kJ/mol, c) -53,3 kJ/mol

3. -25,7 kJ/mol, $7,2 \cdot 10^5$ mol/l

4. 3,5 mmol/l

5. +31,3 kJ/mol, $3,08 \cdot 10^4$

6. +0,8 kJ/mol, -32,6 kJ/mol

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

7. +8,4 kJ/mol, 0,034, +4,41 kJ/mol

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

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

10. $\Delta G^0(1) = -29,25$ kJ/mol, $\Delta G^0 = -8,35$ kJ/mol, $\Delta G = -232$ J/mol

Glykosidovou vazbu sacharosy lze dle standardní volné energie hydrolyzy považovat za makroergickou vazbu, ale sacharosa se nepovažuje za makroergickou sloučeninu. $\Delta G^0(1) = -16,3$ kJ/mol

$$\Delta G^0 = \Delta G^0(3) + \Delta G^0(2) - \Delta G^0(1) - \Delta G^0(4) = -1,7 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta G(4) = -44,25 \text{ kJ/mol}$$

11. $\Delta G^0(1) = -1,7$ kJ/mol

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

$$\Delta G^0 = -16,3 \text{ kJ/mol}$$

12. +7,3 kJ/mol reakce nebude probíhat samovolně

13. a) 0 kJ/mol

$$\text{b) } +2 \text{ kJ/mol, } \Delta G = -11,1 \text{ kJ/mol}$$

F

1b

2. a-oxidoreduktasa

triviálně malátdehydrogenasa

systematicky malát :NAD⁺-oxidoreduktasa (u reakcí s NADH jako donerem, 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

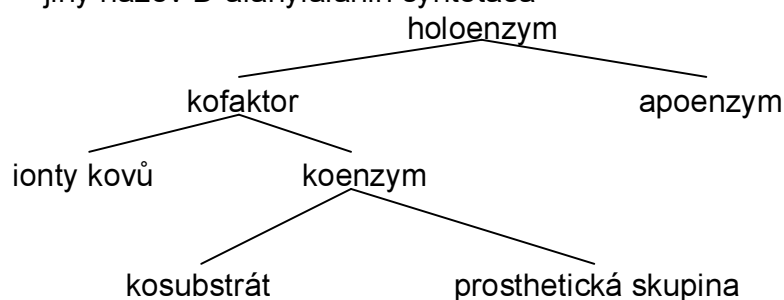
h-ligasa (syntetasa)

triviálně D-alanin-D-alanin ligasa

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

jiný název D-alanylalanin syntetasa

3.



(podléhá cyklické regeneraci)

Jako prostetické skupiny se označují pevně vázané stabilní nepeptidové složky bílkovin. Koenzym nemusí být k enzymu pevně vázán. Pyridoxalfosfát je nepostradatelný při transaminaci a dekarboxylaci aminokyselin. Koenzym A je přenašečem acylů při oxidačním odbourávání mastných kyselin, oxidační dekarboxylaci 2-oxokyselin a při acetylacích.

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

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

$$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}: \text{ a) } 0,015, 0,05; \text{ b) } 0,136, 0,0909; \text{ c) } 0,50, 0,098; \text{ d) } 1,125, 0,0997$$

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.

$$5. \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}: \text{ a) } 0,00488; \text{ b) } 0,197; \text{ c) } 0,00762$$

$$6. K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1 = (10^5 + 10^2) / 10^9 = 1,001 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} = 100,1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$V = k_2 \cdot [E_t] = 10^2 \cdot 0,1 = 10 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$\text{číslo přeměny: } k_2 = V / [E_t] = 100 \text{ s}^{-1}$$

$$v = V \cdot [S] / ([S] + K_m) = 1,665 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$7. \text{ rovnice přímky při vynesení } 1/v_0 \text{ proti } 1/S: y = 2 \cdot 10^{-7} \cdot x + 0,0224$$

$$\text{rovnice přímky při vynesení } S/v_0 \text{ proti } S: y = 0,0222 \cdot x + 2 \cdot 10^{-7}$$

$$9,009 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}, 45,045 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$$

8. a) nekompetitivní inhibice

$$\text{rovnice přímky ze závislosti } 1/v_0 \text{ na } 1/S: y = 6 \cdot 10^{-7} \cdot x + 0,0568$$

$$\text{rovnice přímky ze závislosti } S/v_0 \text{ na } S: y = 0,0568 \cdot x + 6 \cdot 10^{-7}$$

$$6 \cdot 10^{-7} = K_m / V \cdot (1 + i / K_i)$$

$$0,0568 = 1 / V \cdot (1 + i / K_i)$$

$$\text{pro hodnotu } V = 45,045 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ vychází } K_i = 6,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

b) kompetitivní inhibice

$$\text{rovnice přímky ze závislosti } 1/v_0 \text{ na } 1/S: y = 7 \cdot 10^{-7} \cdot x + 0,0224$$

$$\text{rovnice přímky ze závislosti } S/v_0 \text{ na } S: y = 0,0224 \cdot x + 7 \cdot 10^{-7}$$

$$7 \cdot 10^{-7} = K_m / V \cdot (1 + i / K_i)$$

$$0,0224 = 1 / V$$

$$\text{pro hodnotu } K_m = 9,009 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ je } K_i = 8,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

9. kompetitivní inhibice, lze ji zrušit přebytkem substrátu

$$\text{rovnice přímek ze závislosti } 1/v_0 \text{ na } 1/S: y = 10^{-5} \cdot x + 0,00211 \text{ (bez inhibitoru)}$$

$$y = 2 \cdot 10^{-5} \cdot x + 0,00199 \text{ (s inhibitorem)}$$

$$\text{rovnice přímek ze závislosti } S/v_0 \text{ na } S: y = 0,00203 \cdot x + 10^{-5} \text{ (bez inhibitoru)}$$

$$y = 0,00195 \cdot x + 2 \cdot 10^{-5} \text{ (s inhibitorem)}$$

$$2 \cdot 10^{-5} = K_m / V \cdot (1 + i / K_i)$$

$$10^{-5} = K_m / V$$

$$\Rightarrow K_i = 6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$0,00203 = 1 / V \Rightarrow V = 492,6 \text{ nkat}$$

při použití ostatních možných hodnot $1/V$ (0,00211; 0,00199; 0,00195) vyjde

$$\text{průměrné } V = 495 \text{ nkat}$$

$$K_m = 4,95 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$$

10. inhibice kompetitivní

$$\text{rovnice přímek ze závislosti } 1/v_0 \text{ na } 1/S: y = 0,00200 \cdot x + 1,67667 \text{ (bez inhibitoru)}$$

$$y = 0,00510 \cdot x + 1,56814 \text{ (s inhibitorem)}$$

rovnice přímek ze závislosti S/v_0 na S : $y=1,70712 \cdot x+0,00199$ (bez inhibitoru)
 $y=1,63716 \cdot x+0,00507$ (s inhibitorem)

$K_m=1,17 \text{ mmol.l}^{-1}$, $V=0,586 \text{ mmol.min}^{-1}$, $K_i = 0,66 \text{ mmol.l}^{-1}$

11. inhibice nekompetitivní

rovnice přímek ze závislosti $1/v_0$ na $1/S$: $y=0,00854 \cdot x+10,00101$ (bez inhibitoru)
 $y=0,02032 \cdot x+23,16440$ (s inhibitorem)

rovnice přímek ze závislosti S/v_0 na S : $y=10,02169 \cdot x+0,00852$ (bez inhibitoru)
 $y=23,17397 \cdot x+0,02031$ (s inhibitorem)

$K_m = 0,85 \text{ mmol.l}^{-1}$, $V = 0,100 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1}$, $K_i = 7,59 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$

12. rovnice přímky ze závislosti S/v_0 na S : $y=0,104993 \cdot x+0,000185$, $r=0,993$

$K_m = 1,76 \text{ mmol.l}^{-1}$, $V = 9,52 \text{ nkat}$, $v_i = 3,66 \text{ nkat}$

13. a) $0,0049 \mu\text{mol.min}^{-1}$

b) $0,1970 \mu\text{mol.min}^{-1}$

c) $0,1320 \mu\text{mol.min}^{-1}$

14. látkové množství enzymu: $6,25 \cdot 10^{-13} \text{ mol}$

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

15. látkové množství enzymu: $2,0833 \cdot 10^{-12} \text{ mol}$

číslo přeměny = $20 \cdot 10^{-6} / (60 \cdot 2,0833 \cdot 10^{-12}) = 160 \text{ } 000 \text{ s}^{-1}$

16. $\%ES = (1,5 \text{ nkat} / 5 \text{ nkat}) \cdot 100 = 30\%$

17. $K = ([\text{NADH}] \cdot [\text{oxalacetát}] \cdot [\text{H}^+]) / ([\text{NAD}^+] \cdot [\text{jablečnan}])$

výsledné koncentrace složek v systému:

$[\text{jablečnan}] = 0,01 \text{ mmol.l}^{-1}$

$[\text{oxalacetát}] = 0,09 \text{ mmol.l}^{-1}$

$[\text{NADH}] = 0,09 \text{ mmol.l}^{-1}$

$[\text{NAD}^+] = 4,91 \text{ mmol.l}^{-1}$

Dosazením do výše uvedené rovnice získáme hodnotu $[\text{H}^+] = 3,0309 \cdot 10^{-12} \text{ mol.l}^{-1}$.

Pro průběh reakce je nutno zvolit pufr o $\text{pH} = 11,5$.