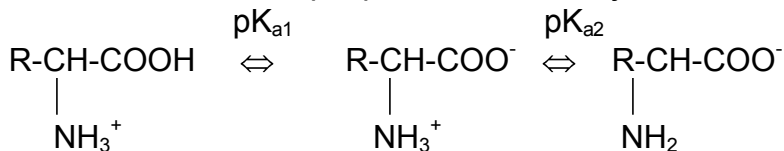


A. AMINOKYSELINY, PEPTIDY A BÍLKOVINY

Chování disociabilních skupin podstatně ovlivňuje vlastnosti aminokyselin a bílkovin:



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

IZOELEKTRICKÝ BOD (pI) AMINOKYSELIN

-odpovídá hodnotě pH, při které je aminokyselina elektroneutrální

Výpočet pI

Obecně:

$$pI = 1/2 (pK_{a1} + pK_{a2})$$

pI je aritmetickým průměrem pK_a kyselé a bazické skupiny

Bazické aminokyseliny:

$$pI = 1/2 (pK_{a2} + pK_{a3})$$

pI bazické aminokyseliny je průměrem pK_a obou bazických skupin

Kyselé aminokyseliny:

$$pI = 1/2 (pK_{a1} + pK_{a3})$$

pI kyselé aminokyseliny je průměrem pK_a obou kyselých skupin

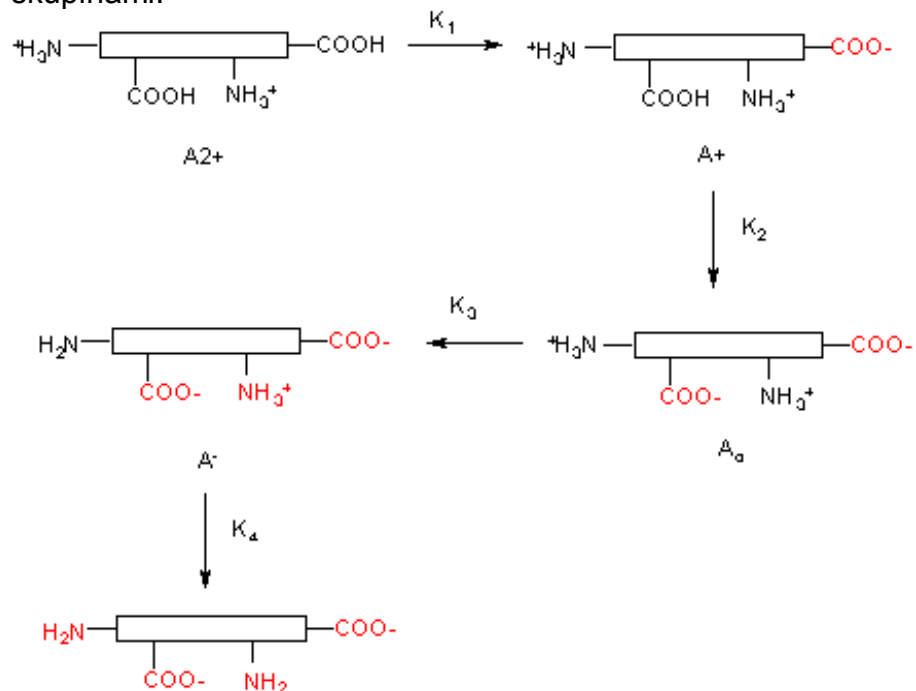
Velmi slabě kyselé AK (Tyr, Cys) $pI = -1/2 \log(K_{a1} \cdot K_{a2} + K_{a1} \cdot K_{a3})$

Při výpočtu pI pro Tyr, Cys je třeba zohlednit příspěvky všech disociabilních skupin

PEPTIDY

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

Disociace peptidů s více disociabilními skupinami:



Výpočet pI peptidů a bílkovin:

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

BÍLKOVINY

Primární struktura bílkovin a její studium

Enzymy a činidla štěpící peptidové vazby:

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

Další reagens:

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

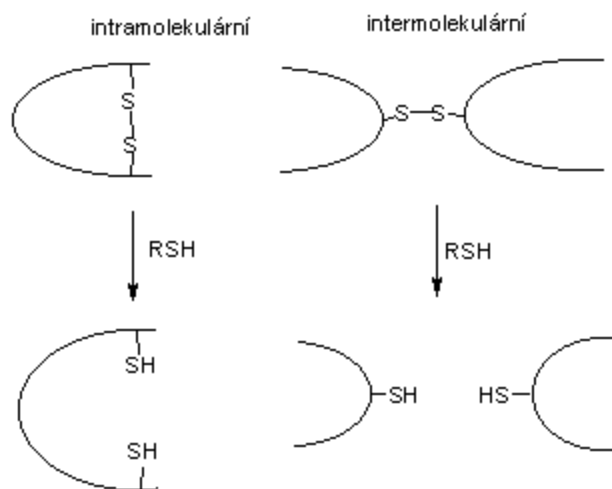
ninhydrin – reakce s $-\text{NH}_2 \rightarrow$ fialové zbarvení (důkaz bílkovin), s Pro žluté zbarvení

močovina – chaotropní činidlo

SDS – detergent

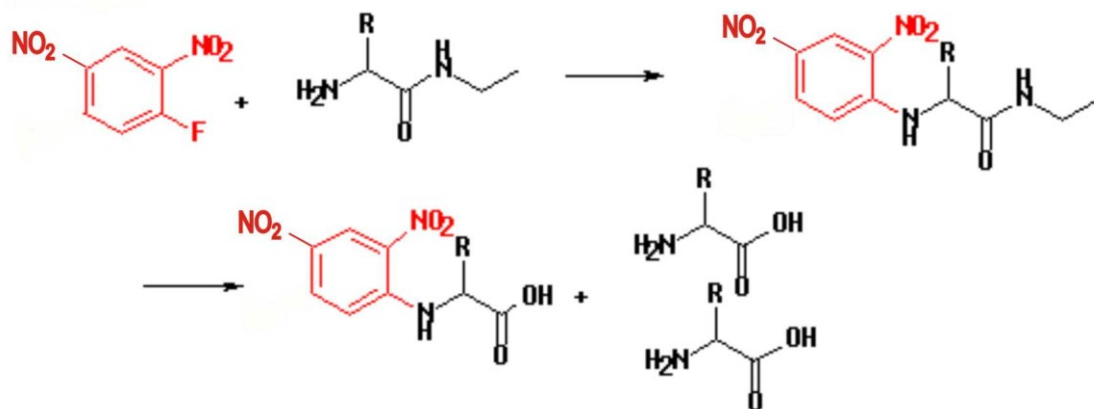
merkapt ethanol, dithiothreitol- redukční činidla (viz obrázek)

Redukce disulfidických můstků merkapt ethanol



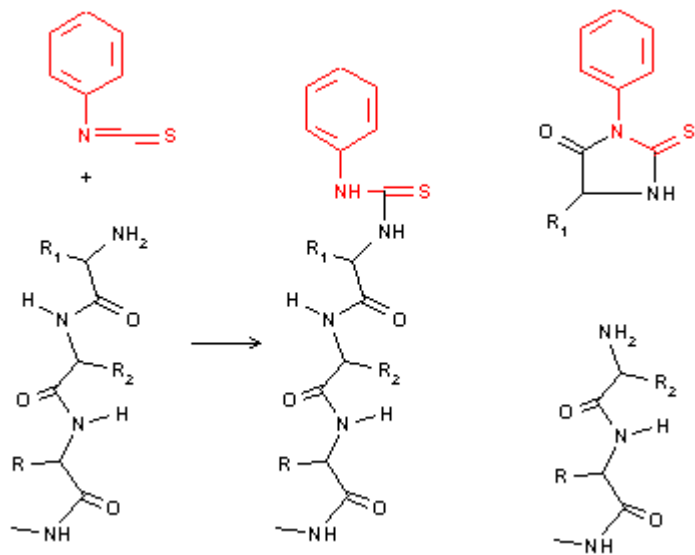
Sangerova reakce

Sangerovo činidlo (2,4-DNFB)



Edmanovo odbourávání

Fenylisothiocyanat



Hmotnostní spektrometrie

- peptide mass fingerprinting (metoda identifikace proteinů na základě peptidového mapování)
- de novo sekvenování proteinů

Sekundární struktura bílkovin

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

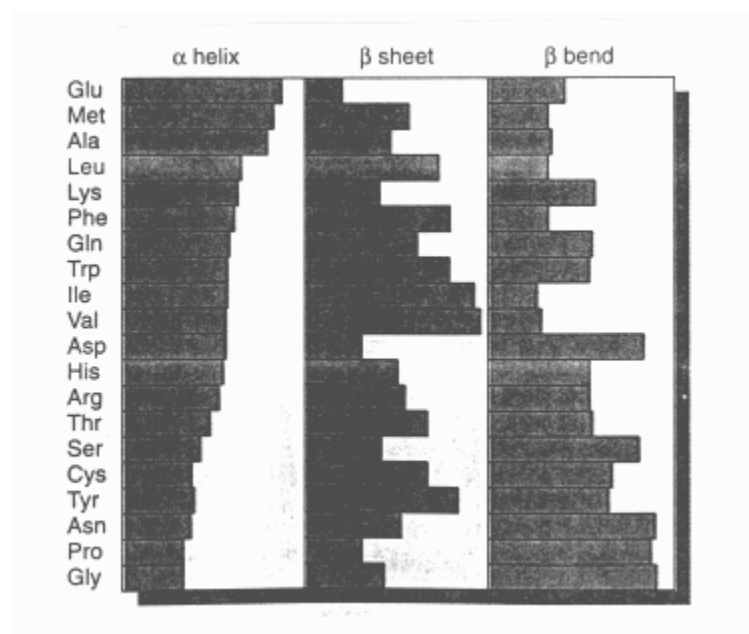
K základním typům sekundární struktury bílkovin patří:

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

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

reverzní smyčka (β -otočka),...

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



Terciární struktura bílkovin

-fibrilární a globulární proteiny

-studium: rentgenová strukturní analýza

Kvarterní struktura bílkovin

-funkční enzym je tvořen více polypeptidovými podjednotkami

Stabilita proteinů

-elektrostatické síly

-vodíkové můstky

-hydrofobní interakce

-disulfidové vazby

ÚLOHY

1. Napište vzorce aminokyselin

- 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.

($\text{pK}_{\text{a}1}=2,4$, $\text{pK}_{\text{a}2}=9,0$)

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:

$\text{pK}_{\text{a}1}=2,34$, $\text{pK}_{\text{a}2}=9,60$

Disociační konstanty threoninu:

$\text{pK}_{\text{a}1}=2,63$, $\text{pK}_{\text{a}2}=10,43$ (Při výpočtu zanedbáme fakt, že disociační konstanty koncových skupin dipeptidu se mohou po kondenzaci změnit)

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

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

Hodnoty pK_a koncových disociabilních skupin jsou:

$\text{pK}_{\text{a}1}=3,6$, $\text{pK}_{\text{a}2}=7,9$

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

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

Hodnoty pK_a koncových disociabilních skupin jsou:

$\text{pK}_{\text{a}1}=3,6$, $\text{pK}_{\text{a}2}=7,9$

7. Následující směs aminokyselin byla podrobena elektroforéze.

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

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

8. Směs aminokyselin byla nasazena na katex v $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl. Napište, které aminokyseliny se pravděpodobně zachytí a které z kolony vytečou. Poté byla kolona promývána pufr o pH 6. Které aminokyseliny se uvolní a které zůstanou vázány: Gly, Ala, Glu, Lys, Arg, Ser

9. Směs aminokyselin byla nasazena na anex při pH=11

Arg, Ala, Glu, Tyr, Ser

- a) Jaký bude celkový náboj každé z aminokyselin? Které aminokyseliny se zachytí na koloně a které vytečou?
- b) Poté byl na kolonu nasazen pufr o pH=8. Jaký bude celkový náboj každé aminokyseliny a které aminokyseliny z kolony vytečou?

10. Směs aminokyselin byla nasazena na katex v $0,1 \text{ M}$ HCl.

Vypočítejte izoelektrický bod každé z aminokyselin.

Napište pořadí, v jakém se budou tyto látky z kolony eluovat při postupném zvyšování pH:

Glu, Ala, His, Lys, Tyr

11. Směs aminokyselin byla nasazena na anex při pH 10. Které aminokyseliny se nezachytí a které zůstanou vázány: Cys, Glu, Ser, Ala, Lys, His

12. Jaké musí být pH pufru, aby bylo možno od sebe oddělit tyto dva peptidy:

a) na sloupci katexu: $\text{NH}_2\text{-Ala-Glu-Gly-Tyr-Lys-COOH}$ (I)

$\text{NH}_2\text{-Gly-Asp-His-Tyr-Lys-COOH}$ (II)

b) na sloupci anexu: $\text{NH}_2\text{-Ser-Tyr-Met-Glu-His-Phe-Arg-Gly-COOH}$ (III)

$\text{NH}_2\text{-Val-Cys-Phe-Glu-Ala-Lys-Leu-Gln-Gly-COOH}$ (IV)

Jaký bude náboj každého peptidu při tomto pH? Popište, zda se peptid zachytí na koloně nebo vyteče.

13. Směs aminokyselin byla nasazena na katex při pH 1,0. Eluce byla provedena gradientem rostoucího pH. Odhadněte pořadí eluce aminokyselin: Gly, Asp, Tyr, Ala, His, Arg

14. Tetrapeptid byl zpracován 2,4-DNFB a hydrolyzován. Značenou aminokyselinou byl 2,4-DNFB-valin a lysin. Hydrolyza trypsinem dala dva štěpy, z nichž první obsahoval aminokyselinu, která po redukci LiBH_4 dává $\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{OH}$ a navíc obsahuje aminokyselinu, která se ninhydrinem barví žlutě. Určete sekvenci tohoto peptidu.

15. Napište, jak byste stanovili sekvenci následujícího peptidu pomocí selektivní hydrolyzy trypsinem a 2,4-dinitrofluorbenzenem.

$\text{NH}_2\text{-Ala-Lys-Glu-Gly-COOH}$

Při dělení meziprojektu hydrolýzy trypsinem použijte metodu iontoměničové chromatografie, popište její podmínky.

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

- a) redukce β -merkaptoethanolem poskytl dva peptidy B a C
- b) Po působení DNFB na peptid P a kyselé hydrolýze v přítomnosti β -merkaptoethanolu 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, hydrolýza 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 hydrolýze 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 -merkaptoethanolem 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 hydrolýze 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 hydrolýze 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 byl zcela ve formě α -šroubovice a zcela ve formě β -skládaného listu
b) celková délka molekuly určité bílkoviny (153 aminokyselin) obsahující pouze α -šroubovici a β -skládaný list je $4,2 \cdot 10^{-6}$ cm. Vypočítejte, jaká frakce molekuly obsahuje α -šroubovici.

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

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

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

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

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

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

Napište vzorec trisacharidu (jsou možné dvě varianty).

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

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

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

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

2,3-di-O-methylribofuranosa

Napište vzorec tohoto disacharidu

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

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

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

Napište vzorec tohoto disacharidu.

b) kys. 2,3,4-tri-O-methylmannuronová

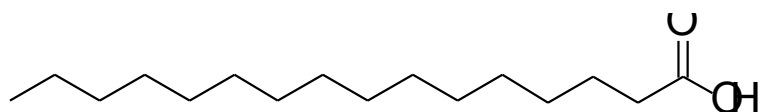
2,3,4,6-tetra-O-metyl- α -D-glukopyranosa

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

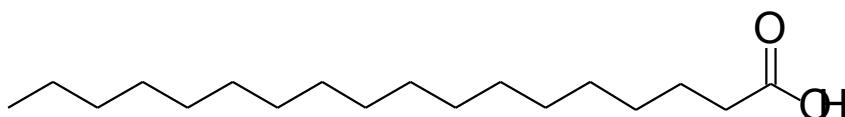
13. Napište vzorec: 3-O- β -D-mannopyranosyl- β -D-fruktofuranosy. Tento disacharid byl methylován pomocí metyljodidu a hydrolyzován v slabé HCl. Napište vzorec produktu.

C. LIPIDY

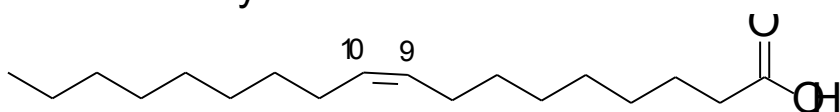
Nejdůležitější přirozené mastné kyseliny:



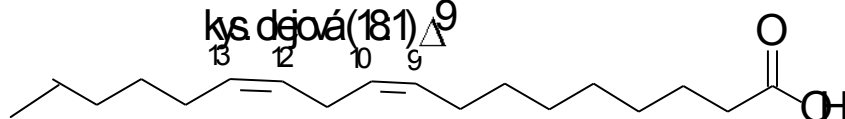
kys. palmitová



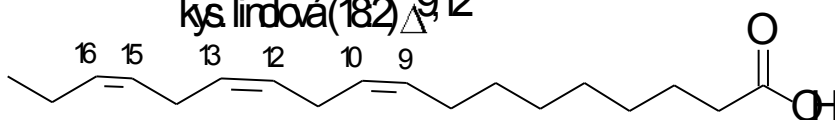
kys. stearová



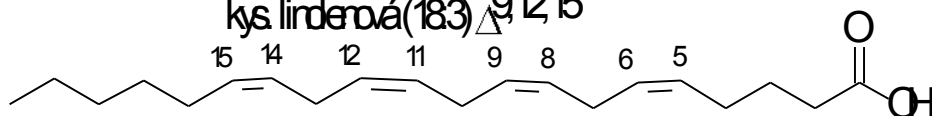
kys. olejová (18:1) Δ^9



kys. liniová (18:2) $\Delta^9,12$

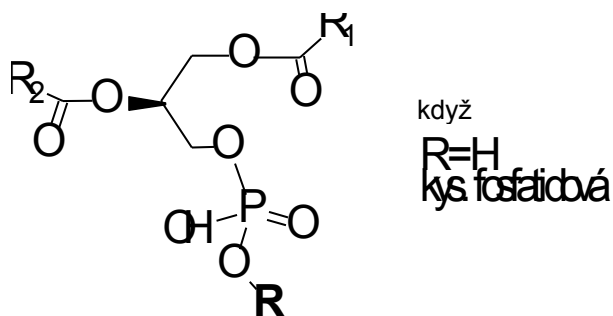


kys. linoiová (18:3) $\Delta^9,12,15$

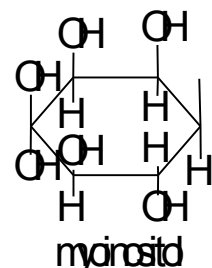
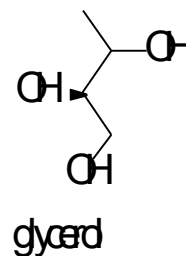
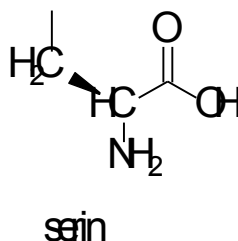
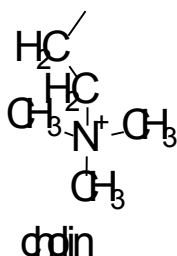
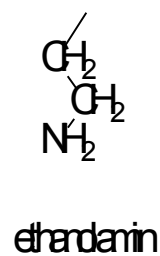


kys. arachidiová (20:4) $\Delta^5,8,11,14$

FOSFOLIPIDY



když $R =$



ÚLOHY

- Všechny lipidy jsou po chemické stránce
a) amidy b) estery c) etery d) acetaly
- Tekutost lipidů je úměrná obsahu
a) vody b) volného glycerolu
c) nasycených mastných kyselin
d) nenasycených mastných kyselin
- Napište vzorce těchto mastných kyselin:
kys. olejová $(18:1)^{\Delta^9}$, kys. linolová $(18:2)^{\Delta^9,12}$
kys. palmitolejová $(16:1)^{\Delta^9}$, kys. linolenová $(18:3)^{\Delta^9,12,15}$

4. Napište vzorce těchto fosfolipidů:

- a) kys. dipalmitoylfosfatidová
- b) 1-palmitoyl-2-oleylfosfatidylcholin
- c) dipalmitoylfosfatidylethanolamin
- d) 1-stearoyl-2-palmitoylfosfatidylglycerol
- e) dioleylfosfatidylserin
- f) 1-stearoyl-2-linoleylfosfatidylserin
[kys. linolová: (18:2)^{Δ9,12}]
- g) 1-palmitoyl-2-oleylfosfatidylglycerol
[kys. olejová (18:1)^{Δ9}]

Jaký bude celkový náboj fosfolipidů při pH 7,5?

Hodnoty pK_a :

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

2x substituovaný fosfát $pK_{a1}=6,8$

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

5. Napište vzorec cholesterolu a očísľujte jej.

6. Fosfolipidy jsou důležitými složkami biomembrán, kterým 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:

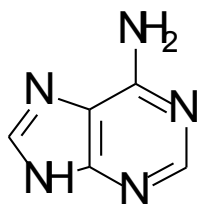
- a) dipalmitoylfosfatidylcholinu
- b) 1-palmitoyl-2-stearoylfosfatidylcholinu
- c) distearoylfosfatidylethanolaminu

Použijte těchto údajů:

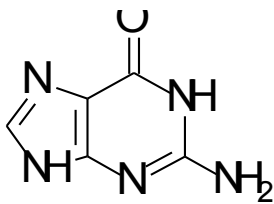
- 1. Selektivního odštěpení acylu v poloze 1 lze dosáhnout fosfolipázou A_1 , v poloze 2 fosfolipázou A_2 .
- 2. Chemicky lze obě mastné kyseliny odštěpit mírnou alkalickou hydrolýzou za katalýzy tetrabutylamonium hydroxidem.
- 3. Acylace glycerolu se provádí příslušnými acylchloridy.
- 4. Hydrolýzu vazby mezi fosfátem a bazí katalyzuje fosfolipasa D. Rovnovážná konstanta této reakce je rovna 1.

D. NUKLEOVÉ KYSELINY

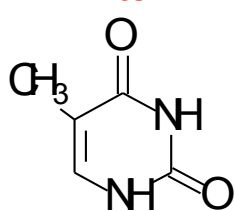
Nukleové baze



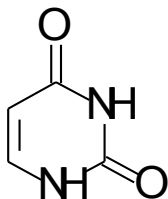
Adenin



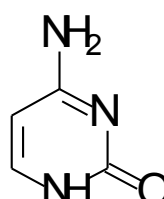
Guanin



Thymin

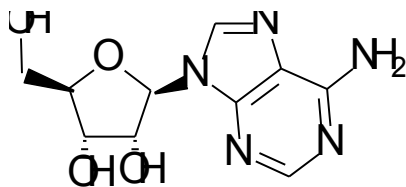


Uracil

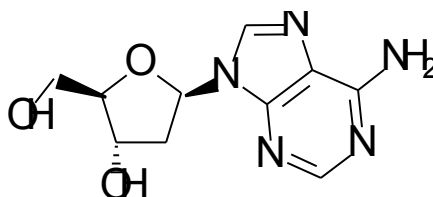


Cytosin

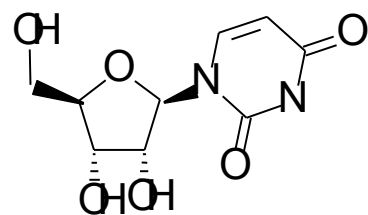
Nukleosidy



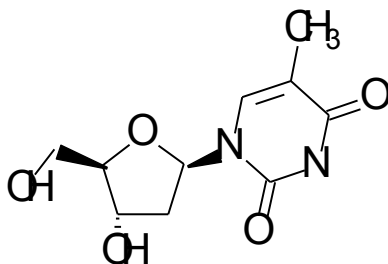
Adenosin



Deoxyadenosin



Uridin



Deoxythymidin

Primární struktura nukleových kyselin

-struktura vazby mezi nukleotidy: viz prezentace

Metody studia primární struktury nukleových kyselin:

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

-Fosfomonoesterázy

hydrolyzují terminální fosfátovou skupinu

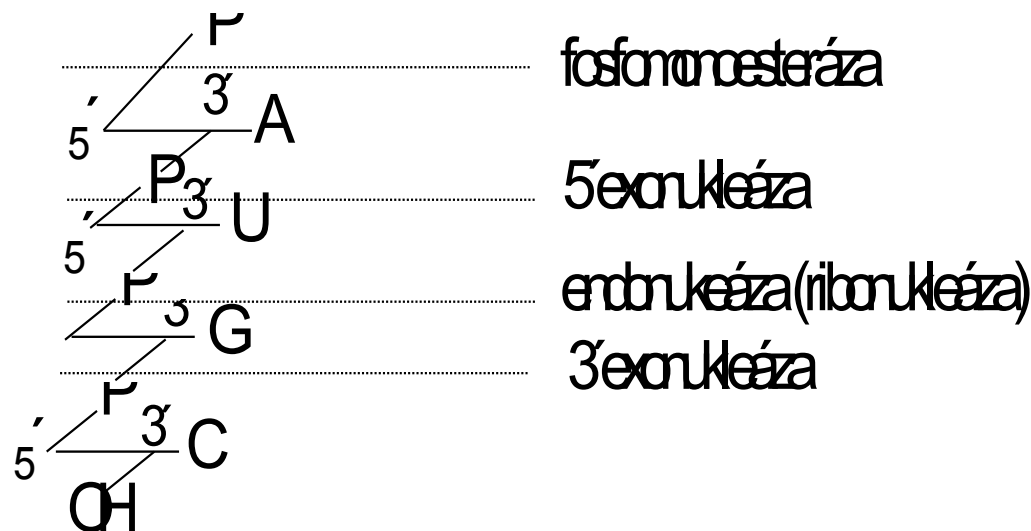
-Fosfodiesterázy:

hydrolyzují fosfodiesterovou vazbu:

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

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

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



Maxam-Gilbertova metoda sekvenace nukleových kyselin:

1. Označení konce nukleové kyseliny pomocí ATP (^{32}P)
2. Specifická chemická hydrolyza před (=na 5' straně):
 - G: působením DMS za tepla
 - G + A: působením kyseliny a DMS
 - C: působením hydrazinu v prostředí 5 M NaCl
 - C + T: působením hydrazinu
3. Elektroforéza získaných fragmentů za denaturačních podmínek (rychlost migrace je nepřímo úměrná počtu nukleotidů)
4. Skenování gelů na fosfoimageru (detekce radioaktivity)

Dnes se používají automatické sekvenátory v servisních laboratořích na bázi modifikované Maxam-Gilbertovy metody (kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescencí).

Sekundární struktura DNA

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

Základní dvojitá šroubovice (**B-DNA**) obsahuje 10 bp (base pair=pár bazí) na jednu otáčku a vzdálenost mezi dvěma následujícími páry bazí je 0,34 nm.

Méně běžné typy:

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

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

Genetický kód mRNA prokaryot:

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

1. Napište vzorce adeninu, nukleosidu a nukleotidu od něho odvozeného.
2. Roztok obsahující AMP a GMP měl 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 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.

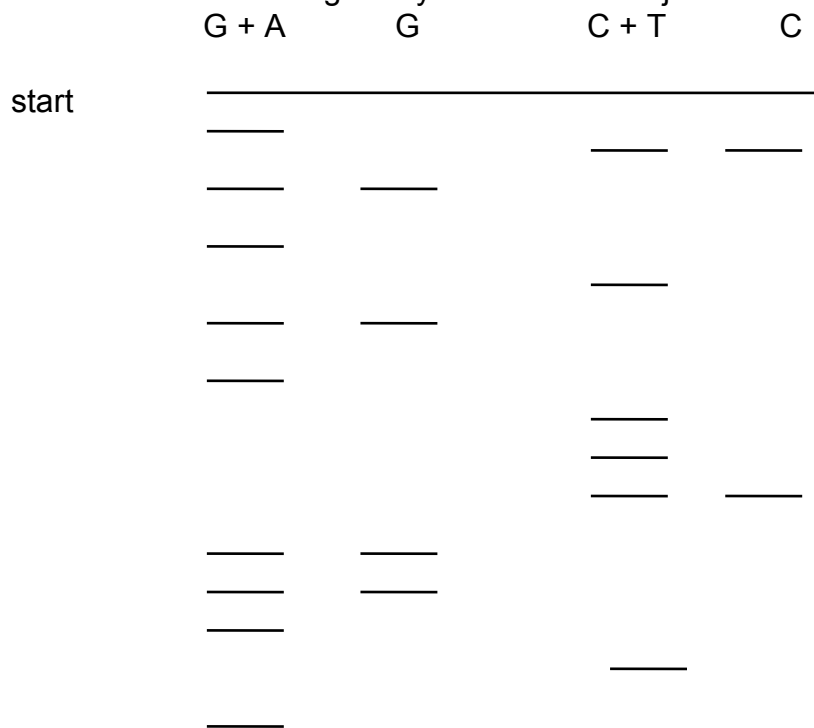
b) hydrolýzou pomocí pankreatické ribonukleázy získáme C, dinukleotid obsahující A a C a dále trinukleotid obsahující A, G a U.

(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. Na fosfoimageru byl získán následující obraz:



E. TERMODYNAMIKA ENZYMŮVÝCH REAKCÍ

Standardní stav v biochemii:

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

Základní vztahy

$$aA + bB \xrightleftharpoons{E} cC + dD$$

$$\Delta G' = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[\text{C}]^c [\text{D}]^d}{[\text{A}]^a [\text{B}]^b}$$

povaha
reakce
(rovnováha)

aktuální
podmínky

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

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

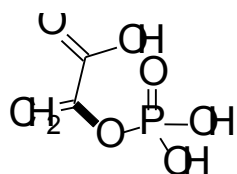
$\Delta G < 0$... exergonická reakce, samovolně probíhá v daném směru
 $\Delta G = 0$... reakce v rovnováze
 $\Delta G > 0$... endergonická reakce, samovolně probíhá v opačném směru

Hodnoty ΔG^0 hydrolýzy důležitých makroergických vazeb

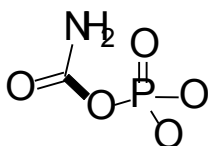
		ΔG^0 [kJ.mol ⁻¹]
fosfoenolpyruvát	$\rightleftharpoons$ pyruvát	-61,8
karbamoylfosfát	$\rightleftharpoons$ karbamát	-51,4
acetylfosfát	$\rightleftharpoons$ k.octová	-43,0
kreatinfosfát	$\rightleftharpoons$ kreatin	-43,0
difosfát	$\rightleftharpoons$ fosfát	-33,4
acetylCoA	$\rightleftharpoons$ acetát	-31,3
ATP	$\rightleftharpoons$ ADP	-30,5
ADP	$\rightleftharpoons$ AMP	-30,5
glukosa-1-fosfát	$\rightleftharpoons$ glukosa	-20,9
glukosa-6-fosfát	$\rightleftharpoons$ glukosa	-12,5

(glycerol-3- fosfát $\rightleftharpoons$ glycerol	-8,4)
---	-------

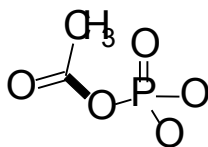
Struktury některých makroergických sloučenin



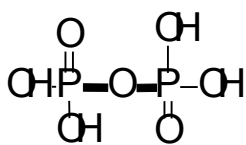
Fosfopyruvát



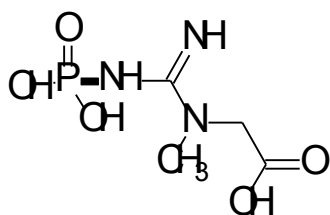
Karbamylfosfát



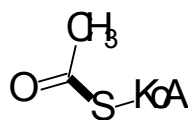
Acylfosfát



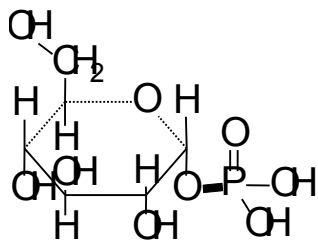
Difosfát



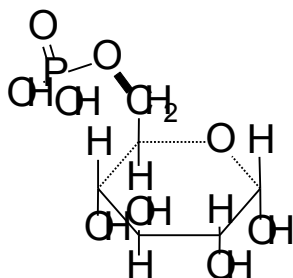
Kreatinfosfát



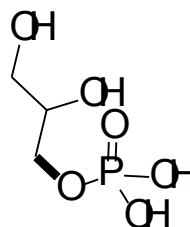
Acetyl-KoA



Glukosa-1-fosfát



Glukosa-6-fosfát



Glycerol-fosfát

Spřažené reakce

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

ÚLOHY

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

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

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

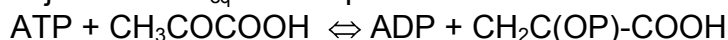
3. Vypočítejte $\Delta G'$ hydrolýzy difosfátu na fosfát, je-li aktuální koncentrace difosfátu 1 mmol.l^{-1} , koncentrace fosfátu 150 mmol.l^{-1} . ΔG° reakce je $-33,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$, teplota 25°C . Vypočítejte rovnovážnou konstantu reakce.

4. Jaká musí být koncentrace malátu, aby reakce:



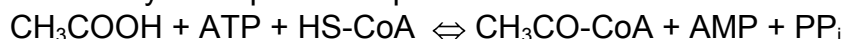
byla v rovnováze, je-li koncentrace fumarátu 1 mmol.l^{-1} , ΔG° reakce je $+3,1 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $t = 25^\circ\text{C}$?

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



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

6. Tvorba acetyl-CoA probíhá v přítomnosti ATP:



(PP_i je difosfát).

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

7. Vypočítejte ΔG° izomerace:



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

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



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

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

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

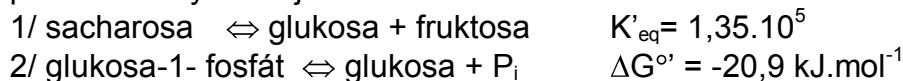


byla při 25°C v rovnováze?

10. Vypočítejte ΔG° reakce při 25°C :



K dispozici máte tyto údaje:

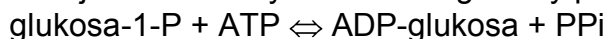


Jaká bude volná energie reakce $\Delta G'$ za aktuálních podmínek:

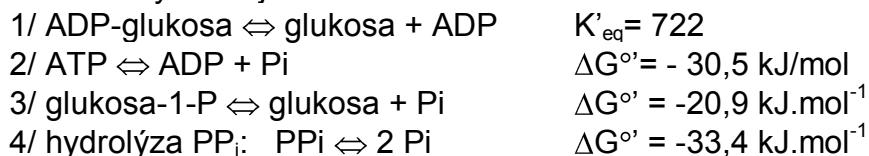
Koncentrace $[\text{P}_i] = 1 \text{ mmol.l}^{-1}$, $[\text{sacharosa}] = 0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, $[\text{glukosa-1-fosfát}] = [\text{fruktosa}] = 4 \text{ mmol.l}^{-1}$.

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

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



K dispozici máte tyto údaje:

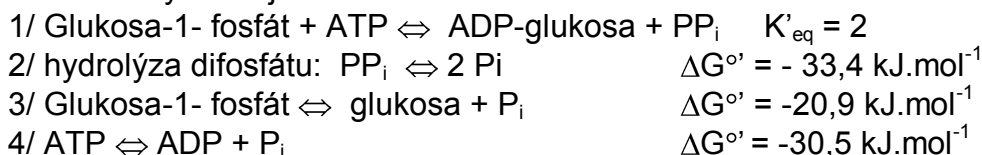


Vypočítejte $\Delta G'$ hydrolýzy difosfátu za aktuálních podmínek koncentrace při 25°C : $[\text{P}_i] = 5 \text{ mmol.l}^{-1}$, $[\text{PP}_i] = 2 \text{ mmol.l}^{-1}$.

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



K dispozici máte tyto údaje:



F ÚVOD DO ENZYMOLOGIE

TŘÍDY ENZYMŮ A JEJICH SYSTEMATICKÉ NÁZVOSLOVÍ

1. Oxidoreduktasy

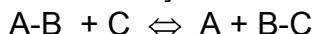


donor:akceptor-oxidoreduktasa

např. glukosa:O₂-oxidoreduktasa, triviálně glukosaoxidasa

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

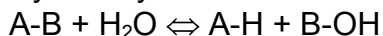
2. Transferasy



donor:akceptor-skupinatransferasa

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

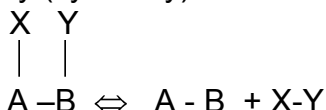
3. Hydrolasy



substrát-skupinahydrolasa

např. protein-amidohydrolasa, triviálně proteasa

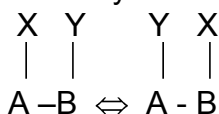
4. Lyasy (synthasy)



substrát-skupinalyasa

např. citrát-oxalacetátlyasa, triviálně citrátsynthasa

5. Isomerasy



komplikované názvosloví, enzym může končit názvem:

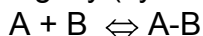
racemasa (katalyzuje stereochemické změny substrátu, např. alaninracemasa)

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

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

mutasa (např. chorismátmutasa)

6. Ligasy (synthetasy)



substrát:substrát-ligasa(tvořící nukleotid)

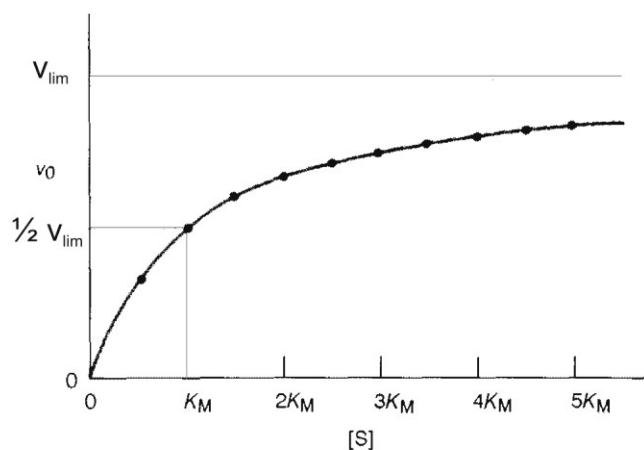
např. alanin:tRNA^{Ala}-ligasa(tvořící AMP), triviálně alanyl-tRNA-synthetasa

KINETIKA ENZYMOVÝCH REAKCÍ

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

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

v_{lim} ... limitní počáteční rychlost



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

Rovnice Michaelise-Mentenové

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

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

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

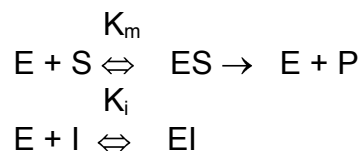
Limitní rychlost lze tedy za podmínek $[S] \rightarrow \infty$, teplotní a pH optimum ztotožnit s **enzymovou aktivitou**.

Jednotky enzymové aktivity: $1 \text{ katal} = 1 \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$
 $1 \text{ IU} = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ (IU=Mezinárodní jednotka)

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

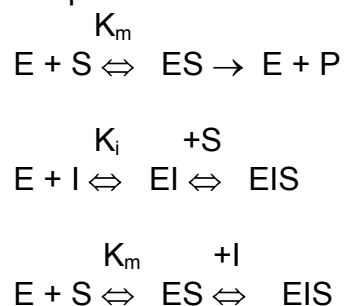
ENZYMOVÁ INHIBICE

Inhibice kompetitivní:

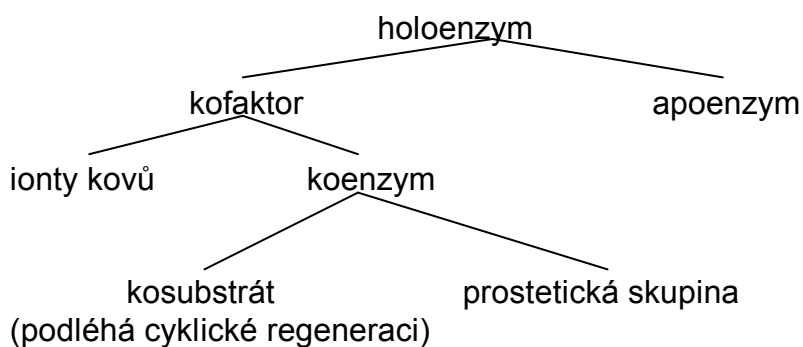


Jestliže $S \rightarrow \infty$, pak $[EI] \rightarrow 0$, a $v_o = v_{lim}$

Inhibice nekompetitivní:



BÍLKOVINNÉ A NEBÍLKOVINNÉ SLOŽKY ENZYMŮ



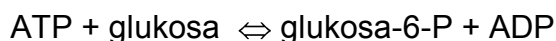
ÚLOHY

1. Enzymy v uzavřeném systému
 - 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 zařadte je podle enzymové nomenklatury (tj. hydrolasa, transferasa, oxidoreduktasa, apod.):

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

3. Glukokinasa a hexokinasa jsou enzymy katalyzující tutéž reakci:



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

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

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

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

0.3, 10 ⁻⁵	10,4
0.5, 10 ⁻⁵	14,5
1. 10 ⁻⁵	22,5
3. 10 ⁻⁵	33,8
9. 10 ⁻⁵	40,5

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

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

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

Vypočítejte Michaelisovu konstantu enzymu pro tento substrát.

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

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

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

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

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

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

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 -COOH skupiny, pak proběhne její disociace na -COO^- . Pokud je pH roztoku nižší než pK_3 postranní aminoskupiny, pak tato skupina přejde na formu -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 -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 elektroneutality.

$pI \leq 8,3$

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**

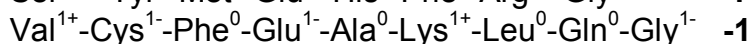
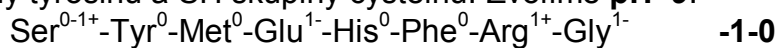
Gly¹⁺-Asp¹⁻-His¹⁺-Tyr⁰-Lys⁰ **1+**

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



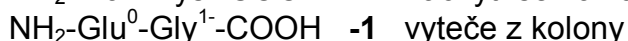
Pokud je pK blízké zvolenému pH, pak je přibližně polovina molekul v disociovaném stavu a druhá polovina v nedisociovaném stavu. Peptid s nábojem -1 až 0 nakonec vyteče, neboť se postupně naprotonují všechny aminoskupiny serinu. Peptid s nábojem -1 se na anexu zachytí.

13. Izelektrické 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-?-?-?

bromkvan: NH₂-Asp-?-?-Met-Glu-COOH

trypsin: NH₂-Asp-Cys-Lys-Met-Glu-COOH

peptid B je tedy:



21. $\text{NH}_2\text{-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Phe-COOH}$
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: $153.0,15 = 22,95\text{nm} = 23\text{nm}$

β -skládaný list: $153.0,36 = 55,08\text{nm} = 55,1\text{nm}$

b) $a+b=153$

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

$a=62$ zbytků tvoří α -šroubovici

$b=91$ zbytků tvoří β -skládaný list

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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-methylgalaktopyranosa, 2,3,6-tri-O-methylglukopyranosa

9. 2,4,6-tri-O-methyl -D-glukopyranosa, 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-mannopyranosa
10. 2,3,4-tri-O-methyl-D-glukopyranosa, 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-galaktopyranosa
11. 5-O-galaktosyl-D-ribofuranosa
12. 4-O-galaktosyl-D-fruktofuranosa
D-glukopyranosyl-D-mannopyranosid uronát
13. 1,4,6-tri-O-methyl-D-fruktosa, 2,3,4,6-tetra-O-methylmannopyranosa

C

- 1.b)estery
- 2.d)
4. Pro disociaci první volné –OH skupiny fosfolipidu platí $pK_a=6,8$, pokud je přítomna i poslední –OH skupina v disociovatelné formě, odpovídá její disociační konstanta $pK_3=12,3$.
a)1-, b)0, c) 0, d) 1-, e) 2-, f) 2-, g) 1-
6. pH 5: a)0, b)1+, c)1+, d)0, e)0, f)0, g)0.
pH 8: a)1-, b)0, c)0, d)1-, e)2-,f)2-,g)1-.
7. a)1-palmitoyl-2-oleylfosfatidylcholin+tetrabutylamonium hydroxid=
glycerolfosfocholin
glycerolfosfocholin+2 palmitoylchlorid= dipalmitoylfosfatidylcholin
b) 1-palmitoyl-2-oleylfosfatidylcholin+fosfolipáza $A_2=$ 1-palmitoylfosfatidylcholin
1-palmitoylfosfatidylcholin+ stearylchlorid=1-palmitoyl-2-stearylfosfatidylcholin
c)1-palmitoyl-2-oleylfosfatidylcholin+ tetrabutylamonium hydroxid=
glycerolfosfocholin
glycerolfosfocholin+ stearylchlorid=distearoylfosfatidylcholin
distearoylfosfatidylcholin+ fosfolipáza D=distearoylfosfatidová kyselina
distearoylfosfatidová kyselina+ethanolamin=distearoylfosfatidylethanolamin

D

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-)

E

1. +7,55 kJ.mol⁻¹, -2,85 kJ.mol⁻¹

2. a) -30,5 kJ.mol⁻¹, b) -47,6 kJ.mol⁻¹, c) -53,3 kJ.mol⁻¹

3. -25,7 kJ.mol⁻¹, 7,2.10⁵ mol.l⁻¹

4. 3,5 mmol.l⁻¹

5. +31,3 kJ.mol⁻¹, 3,08.10⁴

6. +0,8 kJ.mol⁻¹, -32,6 kJ.mol⁻¹

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

7. +8,4 kJ.mol⁻¹, 0,034, +4,41 kJ.mol⁻¹

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

F

1b

2. a-oxidoreduktasa

triviálně malátdehydrogenasa

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

b-transferasa

triviálně alaninaminotransferasa

systematicky L-alanin:2-oxoglutarát-aminotransferasa

jiný název glutamát-pyruvát transaminasa

c-hydrolasa

triviálně exoamylasa nebo β-amylasa

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

jiné názvy glykogenasa nebo sacharogenamylasa

d- oxidoreduktasa

triviálně methanoldehydrogenasa

systematicky methanol:NAD⁺-oxidoreduktasa

jiný název formaldehydreduktasa

e-transferasa

triviálně hexokinasa

systematicky ATP:fruktosa-fosfotransferasa

f-hydrolasa

triviálně ureasa

systematicky močovina-amidohydrolasa

g-izomerasa

triviálně fosfoglukomutasa

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

jiný název glukosafosfomutasa

h-ligasa (syntetasa)

triviálně D-alanin-D-alanin ligasa

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

jiný název D-alanylalanin syntetasa

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

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

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

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

4. 0,00488 μmol.min⁻¹

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

6. kompetitivní inhibici lze zrušit přebytkem substrátu

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

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

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

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

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

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

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