***A.* AMINOKYSELINY, PEPTIDY A BÍLKOVINY**

Chování disociabilních skupin podstatně ovlivňuje vlastnosti aminokyselin a bílkovin:

 pKa1 pKa2

 R‑CH‑COOH ⇔ R‑CH‑COO‑ ⇔ R‑CH‑COO‑

 ⏐ ⏐ ⏐

 NH3+ NH3+ NH2

 Tabulka I. Disociační konstanty aminokyselin

 pKa1 pKa2 pKa 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 ‑NH3+ –> –NH2

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 (pKa1 + pKa2)**

*pI je aritmetickým průměrem pKa kyselé a bazické skupiny*

Bazické aminokyseliny: **pI = 1/2 (pKa2 + pKa3)**

*pI bazické aminokyseliny je průměrem pKa obou bazických skupin*

Kyselé aminokyseliny: **pI = 1/2 (pKa1 + pKa3)**

*pI kyselé aminokyseliny je průměrem pKa obou kyselých skupin)*

Velmi slabě kyselé AK (Tyr, Cys) **pI = -1/2 log(Ka1.Ka2+Ka1.Ka3)**

*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-teminální aminokyseliny |
| Karboxypeptidáza | odštěpení C-terminální aminokyseliny |

Další reagens:

LiBH4 – redukce -COOH -> -CH2OH

ninhydrin – reakce s –NH2 -> fialové zbarvení (důkaz bílkovin), s Pro žluté zbarvení

močovina – chaotropní činidlo

SDS – detergent

merkaptoethanol, dithiothreitol- redukční činidla (viz obrázek)

Sangerova reakce

Sangerovo činidlo (2,4-DNFB)

Edmanovo odbourávání

Fenylisothiokyanat

Hmotnostní spektrometrie

-rutinní identifikace a kvantifikace proteinů na základě sekvenace (fragmentace) peptidů vzniklých štepením trypsinem (“bottom-up“ proteomika)

-sekvenace intaktních proteinů (“top-down“ proteomika, technická omezení)

**Sekundární struktura bílkovin**

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

K základním typům sekudární 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 NH3+ skupiny glycinu při pH: 3,0 a 11,0.

 (pKa1= 2,4, pKa2= 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:

pKa1= 2,34, pKa2= 9,60

Disociační konstanty threoninu:

pKa1= 2,63, pKa2= 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 pKa koncových disociabilních skupin jsou:

pKa1=3,6, pKa2=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 pKa koncových disociabilních skupin jsou:

pKa1=3,6, pKa2=7,9

7. Následující směs aminokyselin byla podrobena elekroforéze.

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 pufrem 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

1. Jaký bude celkový náboj každé z aminokyselin? Které aminokyseliny se zachytí na koloně a které vytečou?
2. 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 izolelektrický bod každé z aminokyselin.

 Napište pořadí, v jakém se budou tyto látky z kolony eluovat při postupném zvyšováni 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 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. Hydrolýza 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 hydrolýzy trypsinem a 2,4-dinitrifluorbenzenu.

 NH2‑Ala‑Lys‑Glu‑Gly‑COOH

Při dělení meziproduktu hydrolýzy trypsinem použijte metodu iontoměničové

chromatografie, popište její podmínky.

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

a) redukce β-merkaptoethanolem pokytne 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 chymotryspinem, 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. Napiště 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 .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 μm.

27. Vypočítejte specifickou hmotnost molekuly tropokolagenu, kterou lze považovat za válec o délce 0,28 μm 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?

***B.* SACHARIDY**

struktura a chem.vlastnosti nejdůležitějších sacharidů – viz prezentace

**ÚLOHY**

1. Nejjednodušší ketosa je a) trehalosa b) fruktosa

 c) erythrulosa d) dihydroxyaceton

2. Ketosy mají hemiacetalový hydroxyl na uhlíku č.

 a) 1 b) 2 c) 3 d) 6

3. Mutarotace je důsledkem přeměny

 a) aldosy na ketosu nebo naopak

 b) hexosy na pentosu "

 c) formy D- na L- "

 d) formy α- na β-

4. Napište vzorce následujících disacharidů:

1. 4‑O‑α‑D‑glukopyranosyl‑α-D‑glukopyranosa

b) 4‑O‑β‑D‑galaktopyranosyl‑α-D‑glukospyranosa

c) α‑D‑mannopyranosyl‑α‑D‑glukopyranosid

1. 4‑O‑β‑D‑mannopyranosyl‑α-D‑galaktopyranosa
2. 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 (CH3I, dimethylsulfát). Tento produkt byl dále podroben mírné kyselé hydrolýze. 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 (HNO3).

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

8. Kyselá hydrolýza trisacharidu dává D‑glukopyranosu a D‑galaktopyranosu v poměru koncentrací 2:1. Úplná methylace trisacharidu a následná hydrolýza dává tyto produkty:

 2,3,6‑tri‑O‑methyl‑D‑galaktopyranosa

 2,3,4,6‑tetra‑O‑methyl‑D‑glukopyranosa

 2,3,4‑tri‑O‑methyl‑D‑glukopyranosa

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‑methyl-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 metylován pomocí metyljodidu a hydrolyzován v slabé HCl. Napište vzorec produktu.

*C.* **LIPIDY**

Nejdůležitější přirozené mastné kyseliny:

**FOSFOLIPIDY**

když

když R =

**ÚLOHY**

1. Všechny lipidy jsou po chemické stránce

 a) amidy b) estery c) etery d) acetaly

2. Tekutost lipidů je úměrná obsahu

 a) vody b) volného glycerolu

 c) nasycených mastných kyselin

 d) nenasycených mastných kyselin

3. Napište vzorce těchto mastných kyselin:

 kys. olejová (18:1)Δ9, kys. linolová (18:2)Δ9,12

 kys. palmitolejová (16:1)Δ9, kys. linolenová (18:3)Δ9,12,15

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‑linoloylfosfatidylserin

 [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 pKa:

1x substituovaný fosfát pKa1= 6,8, pKa2=12,3

2x substituovaný fosfát pKa1= 6,8

serin: pKa1=2,1, pKa2=9,2

5. Napište vzorec cholesterolu a očíslujte jej.

1. 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. (pKa fosfátové skupiny je v oblasti 6‑7).
2. 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

1. distearoylfosfatidylethanolaminu

Použijte těchto údajů:

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

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

1. Acylace glycerolu se provádí příslušnými acylchloridy.
2. Hydrolýzu vazby mezi fosfátem a bazí katalyzuje fosfolipasa D. Rovnovážná konstanta této reakce je rovna 1.

*D.* **TERMODYNAMIKA ENZYMOVÝCH REAKCÍ**

Standardní stav v biochemii:

* t=25°C
* p=0,101 MPa
* **pH=7** (koncentrace [H+] a iontové stavy disociabilních látek)
* jednotkové koncentrace látek
* koncentrace H2O zahrnuta do hodnoty rovnovážné konstanty

**Základní vztahy**

 E

 aA + bB ⇔ cC + dD

 **[C]c[D]d**

 **ΔG’ = ΔG0’ + RT ln --------**

 **[A]a[B]b**

 povaha aktuální

 reakce podmínky

 (rovnováha)

V rovnovážném stavu platí ΔG’=0, proto

 **ΔG°’ = ‑RT ln K’eq**

**ΔG<0 ... exergonická reakce, samovolně probíhá v daném směru**

**ΔG=0 ... reakce v rovnováze**

**ΔG>0 ... endergonická reakce, samovolně probíhá v opačném směru**

**Hodnoty ΔG°’ hydrolýzy důležitých makroergických vazeb**

 ΔG°‘ [kJ.mol‑1]

fosfoenolpyruvát ⇔ pyruvát ‑61,8

karbamoylfosfát ⇔ karbamát ‑51,4

acetylfosfát ⇔ k.octová ‑43,0

kreatinfosfát ⇔ kreatin ‑43,0

difosfát ⇔ fosfát ‑33,4

acetylCoA ⇔ acetát ‑31,3

ATP ⇔ ADP -30,5

ADP ⇔ AMP ‑30,5

glukosa‑1‑fosfát ⇔ glukosa ‑20,9

glukosa‑6‑fosfát ⇔ glukosa ‑12,5

(glycerol‑3‑ fosfát ⇔ glycerol ‑8,4)

**Struktury některých makroergických sloučenin**

**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 25oC. Vypočítejte ΔG‘ reakce, je‑li koncentrace dihydroxyacetonfosfátu 2.10‑4mol.l‑1 a glyceraldehydfosfátu 3.10‑6 mol.l‑1.

2. Vypočítejte ΔG‘ hydrolýzy ATP na ADP a Pi, jsou‑li koncentrace ADP a ATP ekvimolární a koncentrace fosfátu při 25 oC: a) 1 mol.l‑1, b) 0,001 mol.l‑1.

c) Jaká je ΔG‘ hydrolýzy za aktuálních podmínek hydrolýzy ve svalu, kde je koncentrace [ATP] = 5 mmol.l‑1, [ADP] = 0,5 mmol.l‑1, [Pi]= 1 mmol.l‑1při 25oC.

3. Vypočítejte ΔG’ hydrolýzy difosfátu na fosfát, je‑li aktuální koncentrace difosfátu 1 mmol.l‑1, koncentrace fosfátu 150 mmol.l‑1. ΔG°’ reakce je ‑33,4 kJ.mol‑1, teplota 25oC. Vypočítejte rovnovážnou konstantu reakce.

4. Jaká musí být koncentrace malátu, aby reakce:

 malát ⇔ fumarát + H2O

byla v rovnováze, je-li koncentrace fumarátu 1 mmol.l‑1, ΔG°’ reakce je +3,1 kJ.mol‑1, t= 25oC?

5. Vypočítejte ΔG°’ a Keq reakce při 25oC:

 ATP + CH3COCOOH ⇔ ADP + CH2C(OP)‑COOH

Jaký je rovnovážný poměr koncentrací [pyr]/[PEP], je‑li poměr [ATP]/[ADP]=10?

6. Tvorba acetyl‑CoA probíhá v přítomnosti ATP:

 CH3COOH + ATP + HS-CoA ⇔ CH3CO-CoA + AMP + PPi

(PPi je difosfát).

Vypočítejte ΔG°’ reakce (předpokládejte, že ΔG°’ hydrolýzy ATP‑⇔ AMP + PPi je stejné jako při vzniku ADP a Pi; PPi je hydrolyzován pyrofosfatázou). Vypočítejte celkové ΔG°’ reakce při 25oC. Jaký je vliv hydrolýzy difosfátu?

7. Vypočítejte ΔG°’ izomerace:

 glukosa‑6‑fosfát ⇔ glukosa‑1‑ fosfát

Jaký je rovnovážný poměr koncentrace obou látek při 25oC. Jaké je ΔG’ 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 svalu. Jaké je ΔG°’ reakce:

 ATP + kreatin ⇔ ADP + kreatinfosfát

Jaký je rovnovážný poměr kreatin‑ fosfát /kreatin při 25oC, jsou‑li koncentrace ADP a ATP ekvimolární?

9. Koncentrace glukosy v buňce je 1 mmol.l‑1, koncentrace glukosa‑1‑fosfátu 0,05 mmol.l‑1.

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

 ATP + glukosa ⇔ glukosa‑1‑fosfát + ADP

byla při 25oC v rovnováze?

10. Vypočítejte ΔG°’ reakce při 25oC:

 sacharosa + Pi ⇔ glukosa‑1‑ fosfát + fruktosa

K dispozici máte tyto údaje:

 1/ sacharosa ⇔ glukosa + fruktosa K’eq= 1,35.105

 2/ glukosa‑1‑ fosfát ⇔ glukosa + Pi ΔG°’ = ‑20,9 kJ.mol-1

Jaká bude volná energie reakce ΔG’ za aktuálních podmínek:

Koncentrace [Pi]=1 mmol.l-1, [sacharosa]=0,5 mmol.l-1, [glukosa‑1‑ fosfát]=[fruktosa]= =4 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:

 glukosa‑1‑P + ATP ⇔ ADP‑glukosa + PPi

K dispozici máte tyto údaje:

 1/ ADP‑glukosa ⇔ glukosa + ADP K’eq= 722

 2/ ATP ⇔ ADP + Pi ΔG°’= ‑ 30,5 kJ/mol

 3/ glukosa‑1‑P ⇔ glukosa + Pi ΔG°’ = ‑20,9 kJ.mol-1

 4/ hydrolýza PPi: PPi ⇔ 2 Pi ΔG°’ = ‑33,4 kJ.mol-1

Vypočítejte ΔG’ hydrolýzy difosfátu za aktuálních podmínek koncentrace při 25oC: [Pi] = 5 mmol.l-1, [PPi] = 2 mmol.l-1.

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

 ADP‑glukosa + H2O ⇔ glukosa + ADP

K dispozici máte tyto údaje:

 1/ Glukosa‑1‑ fosfát + ATP ⇔ ADP‑glukosa + PPi K’eq = 2

 2/ hydrolýza difosfátu: PPi ⇔ 2 Pi ΔG°’ = ‑ 33,4 kJ.mol-1

 3/ Glukosa‑1‑ fosfát ⇔ glukosa + Pi ΔG°’ = ‑20,9 kJ.mol-1

 4/ ATP ⇔ ADP + Pi ΔG°’= ‑30,5 kJ.mol-1

*E.* **ÚVOD DO ENZYMOLOGIE**

**TŘÍDY ENZYMŮ A JEJICH SYSTEMATICKÉ NÁZVOSLOVÍ**

1. Oxidoreduktasy

A-+ B ⇔ A + B-

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

1. Transferasy

A-B + C ⇔ A + B-C

donor:akceptor-skupinatransferasa

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

1. Hydrolasy

A-B + H2O ⇔ A-H + B-OH

substrát-skupinahydrolasa

např. protein-amidohydrolasa, triviálně proteasa

1. Lyasy (synthasy)

 X Y

 ⏐ ⏐

 A –B ⇔ A - B + X-Y

substrát-skupinalyasa

např. citrát-oxalacetátlyasa, triviálně citrátsynthasa

1. Isomerasy

 X Y Y X

 ⏐ ⏐ ⏐ ⏐

 A –B ⇔ A - B

 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)

1. Ligasy (synthetasy)

A + B ⇔ A-B

substrát:substrát-ligasa(tvořící nukleotid)

např. alanin:tRNAAla-ligasa(tvořící AMP), triviálně alanyl-tRNA-synthetasa

**KINETIKA ENZYMOVÝCH REAKCÍ**

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

KM ... Michaelisova konstanta: Koncentrace substrátu, při níž enzymová reakce probíhá rychlostí rovnou 1/2 vlim

vlim ... limitní počáteční rychlost

 vlim [S]

 vo = --------------- Rovnice Michaelise‑Mentenové

 KM + [S]

Jestliže platí **[S] → ∞** a enzymová reakce probíhá za optimálních podmínek (teplota, pH), pak

 vo= vlim = kkat[E]t

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

Limitní rychlost lze tedy za podmínek [S] → ∞ , teplotní a pH optimum ztotožnit s **enzymovou aktivitou**.

Jednotky enzymové aktivity: 1 katal = 1 mol.s‑1

1 IU = 1 μmol.min‑1 (IU=Mezinárodní jednotka)

Konstanta kkat[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:

 Km

 E + S ⇔ ES → E + P

 Ki

 E + I ⇔ EI

Jestliže S→ ∞ , pak [EI] → 0 , a vo = vlim

Inhibice nekompetitivní:

 Km

 E + S ⇔ ES → E + P

 Ki +S

 E + I ⇔ EI ⇔ EIS

 Km +I

 E + S ⇔ ES ⇔ EIS

**Bílkovinné a nebílkovinné složky enzymů**

 holoenzym

 kofaktor apoenzym

 ionty kovů koenzym

 kosubstrát prostetická skupina

 (podléhá cyklické regeneraci)

**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 zařaďte 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

1. glukosa-6-fosfát → glukosa-1-fosfát
2. D-alanin + D-alanin + ATP → D-alanyl-D-alanin + ADP + Pi

3. Glukokinasa a hexokinasa jsou enzymy katalyzující tutéž reakci:

 ATP + glukosa ⇔ glukosa‑6‑P + ADP

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

a) 0,1 mmol.l‑1

b) 1 mmol.l‑1

c) 5 mmol.l‑1 normální hodnota

d) 30 mmol.l‑1 diabetes

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

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

 konc. substrátu (mol.l‑1) vo (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) vo (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 KM a aktivitu enzymu na základě kinetických měření. Použijte např. grafické vynesení podle Lineweaver-Burka.

 [S] (mol.l-1) vo(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 molek. 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 hmostnost enzymu je 240000.

*F.***GLYKOLÝZA, METABOLISMUS SACHARIDŮ**

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

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

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

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

 Glyceraldehyd‑3‑fosfát + A + B +... ⇔ fruktosa‑6‑P + X + Y + ...

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

 Fru‑6‑P + X + Y + ... ⇔ kys.3‑P‑glycer. + A + B +...

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

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

 fruktosa + ATP ⇔fruktosa‑6‑P + ADP

 b) fosforylace fruktosy fruktokinasou

 fruktosa + ATP ⇔fruktosa‑1‑P + ADP

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

a) v přítomnosti NAD, Pi a ADP

b) v přítomnosti NAD+, ADP, arseničnanu

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

 a) v případě značení na C1

 b) v případě značení na C6

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

10. Jaká bude rovnovážná koncentrace fruktosa‑1,6‑bisfosfátu, glyceraldehyd‑3‑fosfátu a dihydroxyacetonfosfátu, jestliže fruktosa‑1,6‑bisfosfát 1 mmol.l‑1 byl inkubován s aldolasou (ΔGo´= + 24 kJ.mol-1).

11. Zdůvodněte, proč při anaerobní glykolyse musí být glukosa‑6‑fosfát izomerován na fruktosa‑6‑fosfát. Vezměte v úvahu reakční mechanismus aldolasové reakce. Proč tato reakce probíhá s fruktosa‑1,6‑bisfosfátem a nikoliv s glukosa‑1,6‑bis fosfátem?

12. Glukosa značená 14C na C1 byla přidána do směsi obsahující enzymy pentosového cyklu. Jaký je osud radioaktivně značeního uhlíku při přeměně na dvě molekuly triosy ?

13. K enzymům anaerobní glykolysy byla přidána kys. 3-fosfoglycerová značená na uhlíku karboxylové skupiny. Zvratem anaerobní glykolysy byl z této kyseliny synthezován fruktosa‑1,6‑bisfosfát. Jaká bude distribuce radioaktivity v tomto fruktosa‑1,6‑bisfosfátu.

14. Na základě velikosti ΔGo´ odhadněte, které reakce nemohou při glukoneogenesi probíhat zvratem anaerobní glykolysy. Jakým způsobem jsou tyto reakce obcházeny? (Jedna z reakcí probíhá přes nepříznivé ΔGo´. Odhadněte proč.)

1. Určité bakteriální mutanty mají nefunkční triosafosfát izomerázu. Vysvětlete, proč je tato mutace letální pro organismus fermentující glukosu výlučně cestou anaerobní glykolýzy.
2. Vysoké koncetrace pyruvátu inhibují izoenzym laktátdehydrogenasy srdečního svalu, nikoli však izoenzym ze svalu kosterního. Jaké by byly důsledky tohoto efektu, kdyby srdeční sval obsahoval pouze izoenzym totožný s izoenzymem kosterního svalu.

Jaké by byly obrácené důsledky, kdyby kosterní sval obsahoval izoenzym totožný s izoenzymem srdečním?

17. Při glukoneogenezi je termodynamická bariéra tvorby fosfoenolpyruvátu obcházena tvorbou oxalacetátu (koenzym biotin). Napište obě dvě rovnice použité k obchvatu pyruvát kinázové reakce a vypočítejte ΔGo´ souhrnné reakce. (Předpokládejte, že GTP je termodynamicky ekvivalentní ATP).

*G.***CITRÁTOVÝ CYKLUS**

1. Srovnejte ΔGo´ reakcí citrátového cyklu. Které reakce mají tendenci probíhat obráceným směrem a jakým způsobem dochází k posunu reakcí žádoucím směrem?

2. V kterém místě citrátového cyklu dochází k dekarboxylaci :

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

3. V kterém místě citrátového cyklu dochází k oxidaci substrátu

 Přeměna

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

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

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

5. Jaké jsou rovnovážné relativní koncentrace isocitrátu, citrátu a cis‑akonitátu, je‑li ΔGo´ reakcí následující:

 1/ citrát ⇔ cis‑akonitát + H2O ΔGo´ =+8.4 kJ.mol‑1

 2/ cis‑akonitát + H2O ⇔ isocitrát ΔGo´ =‑2.11 kJ.mol‑1

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

a) citrát

b) jantaran

c) malát

Napište vzorce uvedených karboxylových kyselin.

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

k enzymům Krebsova cyklu a k pyruvát dekarboxylase?

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

9. Na základě hodnoty ΔGo´ vypočtené ze standardních redoxpotenciálů zdůvodněte, proč oxidace jantaranu na fumaran v Krebsově cyklu probíhá za účasti FAD jako koenzymu a nikoliv NAD+.

 jantaran + FAD ⇔ fumaran + FADH2

 jantaran + NAD+ ⇔ fumaran + NADH + H+

 Eo´ (FAD/FADH2) = 0,000 V

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

*H.* **RESPIRAČNÍ ŘETĚZEC**

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

 NADH ‑ UQ UQH2‑Cyt c cyt b‑cyt c cyt a‑ 1/2 O2

 cyt c‑cyt a

2. Vypočítejte ΔGo´ reakce mezi:

 a) NADH + UQ

 b) jantaran + UQ

 c) cyt b(red) + cyt c(ox)

 d) cyt c(red) + ½ O2

Na základě velikosti ΔGo´ odhadněte, při které reakci je kryta energetická spotřeba vzniku jedné molekuly ATP (ΔGo´=‑30 kJ.mol‑1).

3. Vypočítejte ΔGo´ oxidace NADH kyslíkem v respiračním řetězci. Kolik molů ATP by teoreticky vzniklo za standartních podmínek (ΔGo´ = ‑30 kJ.mol‑1). Jestliže namísto kyslíku použijeme umělého akceptoru hexakyanoželezitanu (Eo´= +0,360 V), jaká bude změna standardní volné energie reakce a kolik molů ATP vznikne?

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

 jantaran + ADP + ½ O2 ⇔ fumaran + ATP

 isocitrát + ADP + ½ O2 ⇔ jantaran + ATP

 jantaran + ADP + ½ O2 ⇔ oxalacetát + ATP

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

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

 fumaran + ADP + .... ⇔ oxalacetát + ATP + ....

 2-oxoglutarát + ADP +.....⇔ fumaran + ATP + .....

7. Vypočítejte ΔGo´ reakce při 25oC

 fumaran + NADH + H+⇔ jantaran + NAD

 víte‑li, že: Eo´ (NAD/NADH) = ‑0,320 V, Eo´ (fum/jan)= +0,030 V

 Bylo by možné, aby za standardních podmínek byla tato reakce využita k syntéze ATP? (hydrolýza ATP: ΔGo´=‑30 kJ/mol)

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

*I.* **FOTOSYNTÉZA**

 Světelná fáze

Souhrnná rovnice:

 2 ferred.(red) + NADP+ + H+ ⇔ 2 ferred (ox) + NADPH

 H2O + ADP + Pi + Aox ⇔ ½ O2 + 2H+ + ATP + Ared

**Temnostní fáze (Calvinův cyklus)**

fixace:

 CO2 + ribulosa‑1,5‑bisfosfát + H2O ⇔ 2 kys. 3‑fosfoglycerová

redukce:

kys.3‑fosfoglycerová + NADPH + ATP ⇔ glycerald.‑3‑P + NADP + ADP + Pi + H20

syntéza hexózy:

 2P- 3 → P- 6 + Pi

regenerace:

 P- 6 P - 5

 +

 P- 3 P - 4

 + 3 ATP → 3 P- 5 -P + 3ADP

 P- 7 P- 5

 P - 3 P- 3 P- 5

souhrnná rovnice:

 5 P- 3 + 3 ATP → 3 P- 5 -P + 3 ADP + 2Pi

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

2. Vypočítejte Eo a ΔGo´ reakce mezi redukovaným ferredoxinem a NADP při fotosynthese (Eo´ ferredoxinu = ‑0,43 V).

3. K enzymům temné fáze fotosyntézy (fixace CO2) byl přidán ribulosa‑1,5‑bisfosfát a 14CO2. Jaká bude distribuce radioaktivity v kyselině 3‑fosfoglycerové? Jaká bude distribuce readioktivity v tomtéž případě, pokud byl přidán neznačený CO2 a ribulosa‑1,5bisfosfát značený na C5?

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

5. Fotosystém I má v základním stavu standartní redox potenciál Eo´= +0,460 V. Po absorpci světelného kvanta se jeho potenciál změní na Eo´= ‑0,600 V. Vypočítejte rovnovážný poměr koncentrací NADPH/NADP v reakci:

 2 fotosys.I(red) + NADP + H+ ⇔ 2 fotosys.I (ox) + NADPH

s fotosystémem I v základním a excitovaném stavu. Poměr koncentrací oxidovaného a redukovaného fotosystému je roven 1, t = 25oC.

6. Dokažte výpočtem ΔG, zda redukovaný ferredoxin (Eo´ =‑0,430 V) je při fotosyntéze schopen redukovat NADP (Eo´ = ‑0,324 V), pokud poměr koncentrací NADPH/NADP je při 25°C roven 100. Výchozí poměr redukovaného a oxidovaného ferredoxinu je roven 1. Napište rovnici této reakce.

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

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

*J*. **NUKLEOVÉ KYSELINY**

**Nukleové baze**

**Nukleosidy**

**Primární struktura nukleových kyselin**

-struktura vazby nukleotidů: viz prezentace

Metody studia sekvence nukleových kyselin:

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

-Fosfomonoesterázy -

hydrolyzují terminální fosfátovou skupinu

-Fosfodiesterázy:

hydrolyzují fosfodiesterovou vazbu:

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

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

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

Maxam-Gilbertova metoda sekvenace nukleových kyselin:

1. Označení konce nukleové kyseliny pomocí ATP (32P)

2. Specifická chemická hydrolýza v místě:

 G: působením DMS za tepla

 G + A: působením kyseliny a DMS

 C: působením hydrazinu v prostředí 5 M NaCl

 C + T: působením hydrazinu

3. Elektroforéza získaných fragmentů za denaturačních podmínek (rychlost migrace je nepřímo úměrná počtu nukleotidů)

4. Skenování gelů na fosfoimageru (detekce radioaktivity)

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

**Sekundární struktura DNA**

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

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

Méně běžné typy:

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

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

Genetický kód mRNA prokaryot:

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

2. Roztok obsahující AMP a GMP měl absorbanci A260 = 0.652 a A280 = 0.284, vypočítejte koncentraci AMP a GMP v roztoku, jestliže pro AMP je ε při 260 = 15.4 x 103 M-1.cm-1, ε při 280 = 2.5 x 103 M-1.cm-1. Pro GMP ε při 260= 11.7 x 103 M-1.cm-1, ε při 280 = 7.7 x 103 M -1.cm-1.

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

4. Vypočítejte průměrnou molekulovou hmotnost jednoho nukleotidového zbytku DNA a RNA, za předpokladu, že baze jsou přítomny v ekvimolárních koncentracích. Nezapomeňte na kondenzaci vody při vytvoření esterové vazby!

(Molekulové hmotnosti složek: A = 135, G = 151, C = 111, U = 112, T = 126, ribóza 150, kys. fosforečná = 98).

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

UpCpUpApGpAp

Napište produkty hydrolýzy této RNA pomocí následujících enzymů:

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 32P. Jaké oligonukleotidy získáme po působení fosfodiesterázy hadího jedu (viz výše). Které z nich budou značeny 32P?

Které oligonukleotidy získáme hydrolýzou pomocí deoxyribonukleázy II a které z nich budou značeny 32P (deoxyribonukleáza II je endonukleáza uvolňující 3´P oligonukleotidy).

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

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

b) hydrolýzou pomocí pankreatické ribonukleázy získánme 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 fosforimageru byl získán následující obraz:

 G + A G C + T C

start

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

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

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

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

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

a) Jaká je molekulová hmotnost DNA (1 chromosom obsahuje jednu molekulu DNA).

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

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

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

Phe → Leu Lys → Ala Ala → Thr Phe → Lys Ile → Leu

His → Glu Pro → 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 hmostnosti 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 32P na γ-fosfátu byla inkubována s RNApolymerázou: Po určité době byla zjištěna inkorporace 100 molekul značeného fosfátu do výsledného produktu. Tentýž pokus byl proveden se směsí nukleosidtrifosfátů značených na fosfátu α. Byla zjištěna inkorporace 3.104 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 restrikční místo TT/CGAA

a jiné restrikční místo A/GATCT a to za podmínky, že nedojde ke změně sekvence aminokyselin ve vzniklém peptidu.

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

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

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

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

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

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

Vypočítejte frekvenci všech kodonů a zdůvodněte odpovídající aminokyselinové složení polypeptidů.

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

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

*K*. **REDOXNÍ REAKCE**

Pro redukci látky obecně platí

 [ox] + e- ⇔ [red]

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

 **RT** **[ox]**

 **E´ = Eo´ + ------ ln ---------**

 **nF** **[red]**

 standardní aktuální

 redox pot. koncentrace složek

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

F = 96500 C.mol‑1 R; R = 8,314 J.K‑1.mol‑1

Reakce mezi dvěma redoxními systémy:

 (ox)1 + (red)2 ⇔ (red)1 + (ox)2

 Pokud je systém **v rovnováze**, platí ΔG´ = 0 a E1= E2

 RT [ox1] RT [ox2]

Eo´1 + ----- ln -------- = Eo´2 + ----- ln --------

 nF [red1] nF [red2]

 RT [ox2][red1]

Eo´1 - Eo´2 = ----- ln ---------------

 nF [red2][ox1]

 [ox2][red1] RT

Keq = ---------------- => Eo´1 - Eo´2 = ------- ln Keq

 [ox1][red2] nF

 **ΔGo’= ‑ RT ln Keq**

 ΔGo’

Eo´1 - Eo´2 = -------

 nF

 **ΔGo´= ‑nF ΔEo´**

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

 **oxidovaná/redukovaná forma Eo´ [V]**

 acetát/acetaldehyd ‑0,580

 NAD+/NADH ‑0,320

 NADP+/NADPH ‑0,324

 acetaldehyd/ethanol ‑0,197

 pyruvát/laktát ‑0,185

 oxalacetát/malát ‑0,166

 ubichinon/ubihydrochinon +0,100

 2cyt b(ox)/2cyt b(red) +0,030

 fumaran/jantaran +0,031

 2cyt c(ox)/2cyt c(red) +0,235

 2cyt a(ox)/2cyt a(red) +0,385

 ½ O2 /H2O +0,816

1. Vypočítejte redoxní potenciál E´ směsi NAD/NADH, je‑li koncentrace NAD 1 mmol.l‑1, NADH 10 mmol.l‑1.

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

 malát + NAD+ ⇔ oxalacetát + NADH + H+

 pyruvát + NADH + H+⇔ laktát + NAD+

 malát + pyruvát ⇔ oxalacetát + laktát

 acetaldehyd + fumarát ⇔ acetát + jantaran

1. Vypočítejte rovnovážnou konstantu reakce ze standardního redox potenciálu Eo´ (t=25oC)

malát + NAD+ ⇔ oxalacetát + NADH + H+

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

 pyruvát + NADH + H+ ⇔ laktát + NAD+

byla při 25oC v rovnováze, je‑li poměr koncentrací pyruvát/laktát = 1.

5. Vypočítejte ΔG reakce:

 jantaran + NAD+ ⇔ fumaran + NADH + H+

je‑li koncentrace NAD 10 mmol.l‑1, NADH 1 mmol.l‑1, jantaranu 10 mmol.l‑1, fumaranu 5 mmol.l‑1, t=25oC.

6. Vypočítejte ΔG reakce při 25oC

 NADH + H+ + UQ ⇔ UQH2 + NAD+

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

Eo´(UQ/UQH2)= +0.104 V, Eo´(NAD+/NADH) = ‑0,320 V

7. Určete ΔGo´ reakce:

 acetaldehyd + fumaran ⇔ acetát + jantaran

Eo´ (acetát/acetaldehyd) = ‑0,580 V, E´o (jantaran/fumaran) = 0,030 V. V jakém směru bude reakce probíhat?

8. Určete ΔGo´ reakce:

 cyt c2+ + cyt a3+ ⇔ cyt c3+ + cyt a2+

Eo´ (cyt c3+ / cyt c2+)= +0,235 V, Eo´ (cyt a3+ / cyt a2+) =+0,385 V. V jakém směru bude reakce probíhat?

9. Vypočítejte ΔGo´reakce:

 cyt a(red) + ½ O2 + 2H+ ⇔ cyt a(ox) + H2O

Eo´(cyt a(ox)/cyt a (red)) = 0,385 V , Eo(½ O2 /H2O)= 0,816 V. Je‑li ΔGo´ syntézy ATP z ADP a Pi +30 kJ.mol-1, kolik molekul ATP může vzniknout při této reakci za standardních podmínek?

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

NADH + H+ + aldehyd → NAD + alkohol

Eo (acetaldehyd/ethanol) = -0,197 V; Eo (NAD+/NADH) = -0,320 V.

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

 Acetaldehyd + oxid. koenzym → acetát + red. koenzym

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

Eo´ (acetát/acetaldehyd) = -0,580 V, Eo´ (NAD+/NADH) = -0,320 V, Eo´ (FAD/FADH2) = 0,000 V.

**VÝSLEDKY ÚLOH**

**A. AMINOKYSELINY, PEPTIDY A BÍLKOVINY**

1. a) Phe, Tyr, Try, His

b) Cys, Met

c) His, Lys, Arg

d) Ala, Gly, Phe, Ser, Val, Asp, Glu, Cys, Tyr, Asn, Gln, Try, Leu, Ile, Met, Thr, Pro

e) Gly, Ala, Leu, Ile, Val

f) žádný asymetrický uhlíkový atom: Gly

 dva asymetrické uhlíkové atomy: Ile, Thr

2.

1. postupná disociace glycinu: A+→ A → A-

K1=[A].[H+]/[A+]

K2=[A-].[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].100/([A+]+[A]+[A-])=79.9% disociované formy karboxylové skupiny při pH=3

[A].100/([A+]+[A]+[A-])=0.99% NH3+ při pH 11

1. NH2-Thr-Gly-COOH; pI=6,385 (pro NH2-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 pK3 postranní -COOH skupiny, pak proběhne její disociace na -COO-. Pokud je pH roztoku nižší než pK3 postranní aminoskupiny, pak tato skupina přejde na formu -NH3+.

 při pH=5:

 Arg++-His+-Gly0-Phe0-Gly0-Glu1--Lys+-Tyr0-Cys0-Ala1-, celkem **2+**

při pH=9:

Arg1,5+-His0-Gly0-Phe0-Gly0-Glu1--Lys+-Tyr0-Cys1--Ala1-, 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 pK2=9,0 a disociační konstanta cysteinu pK3=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 elektroneutrality.

pI≤8,3

Pokud je izoelektrický bod přibližným aritmetickým průměrem pKA neutrální formy, pak bude první uvažovanou disociací deprotonace cysteinu (pK3=8,3) při pH vyšším než pI a druhou reakcí bude protonace koncové skupiny o pKa2=7,9 při pH nižším než pI.

Výsledný izoelektrický bod: pI=8,1.

 6. disociabilní skupiny v peptidech A a B:

1. Ser-NH2(9,2), Tyr-OH(10,9), Glu-COOH(4,3), His-NH(6,0), Arg=NH(12,5), Gly-COOH(2,4)
2. 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)

1. 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.

1. 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.

1. 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.

1. 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**:

 Ser0-1+-Tyr0-Met0-Glu1--His0-Phe0-Arg1+-Gly1- **-1-0**

 Val1+-Cys1--Phe0-Glu1--Ala0-Lys1+-Leu0-Gln0-Gly1- **-1**

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

1. NH2-Val‑Lys‑Pro‑Gly-COOH, popř. NH2-Val‑Lys‑Gly‑Pro-COOH
2. 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:

NH2-Ala1+-Lys0-COOH **+1**  zachytí se na katexu

NH2-Glu0-Gly1--COOH **-1** vyteče z kolony

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:

 NH2-Leu-Gly-Lys-Cys-Phe-Ala-COOH

 struktura peptidu P:

 (NH2-Asp-Cys-Lys-Met-Glu-COOH

 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-merkaptoethanolu:

Asn1-Cys2-Phe3-Thr4-Lys5-Lys6-Trp7-Cys8-Arg9-Ala10-Val11-Cys12

Cys13-Thr14-Pro15-Tyr16-Cys17-Phe18-Pro19-Cys20

1. NH2-Val11-Cys12-Cys2- Asn1-COOH
2. NH2-Phe3-Thr4-Lys5-Lys6-COOH
3. NH2-Trp7-Cys8-Arg9-Ala10-COOH

 SS

 NH2-Tyr16-Cys17-COOH

1. 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: 153.0,15 = 22,95nm = 23nm

 β-skládaný list: 153.0,36= 55,08nm = 55,1nm

 b) a+b=153

 a.0,15+b.0,36=42nm

 a=62 zbytků tvoří α-šroubovici

 b=91 zbytků tvoří β-skládaný list

25. počet aminokyselin=(0,2.109nm)/0,15nm= 1,3333.109

 rychlost syntézy=1,3333.109/(365.24.3600)=42,3 zbytků/sec

26. hmotnost ribozomálních proteinů=25000.(4/3).π.(9.10-7cm)3.1g/cm3.0,4 = 3,0536.10-14g

 délka β-šroubovice=(3,0536.10-14/120).6,023.1023.0,36=5,5176.107nm=0,055m

 délka jednoho ovinutí=π.1=3,1416μm=3141,6nm

 počet ovinutí=5,5176.107/3141,6=1,76.104 krát

1. V=π.0,72.280=431,027nm3=4,3103.10-19cm3

m=3.1000.120/(6,023.1023)=5,9771.10-19g

ρ=m/V=5,9771.10-19g/4,3103.10-19cm3=1,39 g/cm3

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

**B. SACHARIDY**

1d

2b

3d

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

 2,3,4,6‑tetra‑O‑methylgalaktosa

6. glucitol, kys. mannonová, kys. mannarová

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

1. 2,4,6-tri-O-methyl -D-glukopyranosa, 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-mannopyranosa
2. 2,3,4-tri-O-methyl-D-glukopyranosa, 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-galaktopyranosa
3. 5-O-galaktosyl-D-ribofuranosa
4. 4-O-galaktosyl-D-fruktofuranosa

 D-glukopyranosyl-D-mannopyranosid uronát

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

**C. LIPIDY**

1.b)estery

2.d)

4. Pro disociaci první volné –OH skupiny fosfolipidu platí pKa=6,8, pokud je přítomna i poslední –OH skupina v disociovatelné formě, odpovídá její disociační konstanta pK3=12,3.

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

1. pH 5: a)O, 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‑.

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

 glycerolfosfocholin+2 palmitoylchlorid= dipalmitoylfosfatidylcholin

 b) 1-palmitoyl-2-oleylfosfatidylcholin+fosfolipáza A2= 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. TERMODYNAMIKA ENZYMOVÝCH REAKCÍ**

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

Hydrolýza 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. ΔG0’=12,5 kJ.mol-1, 6,42.10‑3

9. ΔG0’= -9,6 kJ.mol-1, 1,04.10‑3

1. ΔG0’(1)=-29,25 J.mol-1, ΔG0=-8,35 J.mol-1, ΔG=241 J.mol-1

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

1. ΔG0’(1)= -16,3 kJ.mol-1

 ΔG0’= -ΔG0(1)+ +ΔG0(2)+ΔG0(3)-ΔG0(4)

 ΔG0’= -1,7 kJ.mol-1

 Za podmínek zadaných koncentrací je ΔG’= -27,1 kJ.mol-1

1. ΔG0’(1)= -1,7 kJ.mol-1

 ΔG0’(spřažená reakce)= -16,3 kJ.mol-1

**E. ÚVOD DO ENZYMOLOGIE**

1b

1. a-oxidoredutasa

 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

1. glukokinasa: v=1,5⋅10-6⋅[S]/([S]+10⋅10-3)

hexokinasa: v=0,1⋅10-6⋅[S]/([S]+0,1⋅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.

1. 0,00488 μmol.min-1
2. KM=9,009⋅10-6 mol l-1, vlim=45,045 μmol.min-1
3. kompetitivní inhibici lze zrušit přebytkem substrátu
4. KM=1,17 mmol.l-1, vlim =0,586 mmol.min-1
5. KM = 0,85 mmol.l-1, vlim = 0,100 μmol.min-1
6. KM = 1,76mmol.l-1, vlim = 9,52 nmol.s-1
7. látkové množství enzymu: 6,25⋅10-13 mol

 aktivita=6,25⋅10-13⋅2500=1,56nkat=0,0936 μmol.min-1

1. látkové množství enzymu: 2,0833⋅10-12 mol

 číslo přeměny=20⋅10-6/(60⋅2,0833⋅10-12)=160 000 s-1

**F. GLYKOLÝZA, METABILOSMUS SACHARIDŮ**

1. C2 obou trios
2. 2,5
3. ne
4. 2 glyceraldehyd-3-P + H2O → fruktosa-6-P + P
5. fruktosa-6-P + 2 P + ADP+ 2 NAD+ → 2 kys.3-P-glycerová + ATP + 2 NADH + 2 H+

 1NADH je ekvivalentní 3ATP

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

1. pyruvát, laktát, alanin
2. a) hexokinasa

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

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

 b) fruktokinasa

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

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

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

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

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

9. methylová skupina v obou případech

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

11. mechanismus aldolové kondenzace

1. odštěpí se jako 14CO2
2. C3, C4
3. i) fruktosa-1,6-bisP + ADP → fruktosa-6-P + ATP NEPROBÍHÁ(ΔGO=+14,2kJ/mol)

 ve skutečnosti:

 fruktosa-1,6-bisP + H2O → fruktosa-6-P + P FRUKTOSABISFOSFATASA

 ii) glukosa-6-P + ADP → glukosa + ATP NEPROBÍHÁ(ΔGO=16,7kJ/mol) ve skutečnosti:

 glukosa-6-P + H2O → glukosa + P GLUKOSA-6-FOSFATASA

 iii) pyruvát + ATP → fosfoenolpyruvát + ADP NEPROBÍHÁ (ΔGO= +31kJ/mol)

 ve skutečnosti:

1. fosfoenolpyruvátsynthetasa (bakterie)
2. pyruvát + ATP + CO2 → oxalacetát + ADP + P

oxalacetát + GTP → fosfoenolpyruvát + GDP + CO2

 Přes nepříznivé ΔGO probíhá reakce:

 fruktosa-1,6-bisP → glyceraldehydfosfát + dihydroxyacetonfosfát

1. hromadí se dihydroxyacetonfosfát dle výsledné bilanční rovnice:

glukosa + P → dihydroxyacetonfosfát + laktát NEPRODUKUJE SE ENERGIE!

16. LDH srdečního svalu (izoenzym H4) je vhodnější pro oxidaci laktátu na pyruvát. Pokud by se zde uplatnila LDH kosterního svalu, mohl by se v srdečním svalu hromadit laktát.

LDH kosterního svalu (izoenzym M4) je lépe uzpůsobena pro oxidaci pyruvátu na laktát, což umožňuje kosternímu svalu pracovat na "kyslíkový dluh". Při nedostatku kyslíku se hromadí NADH vznikající při anaerobní glykolýze a likviduje se redukcí pyruvátu na laktát (únava). Svalové buňky předávají laktát do krve, následně může být v játrech přeměněn na glukosu.

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

II) oxalacetát + GTP → fosfoenolpyruvát + CO2 + GDP

Souhrnná reakce:

pyruvát + 2 ATP → fosfoenolpyruvát + 2 ADP + P

[součet: a) pyruvát + ATP → fosfoenolpyruvát + ADP (ΔGO= +31kJ/mol)

 b) ATP = ADP + P (ΔGO= -30,5kJ/mol)]

ΔGO(celk) = +0,5 kJ/mol

**G. CITRÁTOVÝ CYKLUS**

1. malát + NAD+ → oxalacetát + NADH + H+

 citrát → isocitrát

2. b,e

3. a,b

4. oxoglutarát + NAD+ + GDP + P → jantaran + CO2 + NADH + H+ + GTP

5. K1=0,0336397

 K2=2,3444484

 citrát → isocitrát, ΔG0= 6,29 kJ/mol, K=0,0788666

 cis-akonitát/citrát=0,0336, isocitrát/cis-akonitát=2,3444, isocitrát/citrát=0,07887

 [citrát]=1, [isocitrát]=0,07887, [cis-akonitát]=0,03364, tedy 0,079:1:0,034

6. postupným sčítáním reaktantů a produktů dostaneme bilanční rovnice:

 a) citrát + 3 NAD+ + GDP + P + FAD + H2O → oxalacetát + 2CO2 + 3 NADH + 3H+ + + GTP + FADH2

b) jantaran + FAD + H2O + NAD+ → oxalacetát + FADH2 + NADH + H+

c) malát + NAD+ → oxalacetát + NADH + H+

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

1. uvolní se jako 14CO2
2. C1 oxalacetátu
3. C2 a C4 oxalacetátu
4. v citrátu na C2

v isocitrátu na C2 a C4

1. reakce s FAD: ΔG0=5,98 kJ/mol

 reakce s NAD+: ΔG0=67,7 kJ/mol

**H. RESPIRAČNÍ ŘETĚZEC**

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

dvouelektronové: NADH

NADH + H+ + UQ → NAD+ + UQH2

UQH2 + cyt c (ox) → UQH⋅ + H+ + cyt c (red)

UQH2 + 2 cyt c (ox) → UQ + 2H+ + 2 cyt c (red)

cyt c (red) + cyt b (ox) → cyt c (ox) + cyt b (red)

2 cyt a (red) + 1/2 O2 + 2H+→ 2 cyt a (ox) + H2O

cyt c (red) + cyt a (ox) → cyt c (ox) + cyt a (red)

1. Ve vzorci ΔGO= -n ⋅ F ⋅ ΔEO se při výpočtu ΔEO odečítá od redoxního potenciálu složky, která vystupuje na levé straně rovnice v oxidované podobě, redoxní potenciál složky, která je zde v podobě redukované.

 a) NADH + H+ + UQ → NAD+ + UQH2

 E0/NAD+= -0,32V

 E0/UQ= +0,10V

 ΔGO= -n ⋅ F ⋅ ΔEO= -2 ⋅ 96500 ⋅ (0,10-(-0,32))= -81,06 kJ/mol

 Kryta energetická spotřeba vzniku dvou ATP.

 b) jantaran + UQ → fumarát + UQH2

 E0/fum= 0,031V

 E0/UQ= 0,10V

 ΔGO= -n ⋅ F ⋅ ΔEO= -2 ⋅ 96500 ⋅ (0,1-0,031)= -13,317 kJ/mol

 c) 2 cyt b (red) + 2 cyt c (ox) → 2 cyt b (ox) + 2 cyt c (red)

 ΔGO= -n ⋅ F ⋅ ΔEO= -2 ⋅ 96500 ⋅ (0,235-0,03)= -39,57 kJ/mol

 Kryta energická spotřeba vzniku jednoho ATP.

 d) 2 cyt c (red) + 1/2 O2 + 2H+ → 2 cyt c (ox) + H2O

 ΔGO= -n ⋅ F ⋅ ΔEO= -2 ⋅ 96500 ⋅ (0,816-0,235)= -112,13 kJ/mol

 Kryta energetická spotřeba vzniku tří ATP.

1. a) NADH + 1/2 O2 + H+ → NAD+ + H2O

 ΔGO= -n ⋅ F ⋅ ΔEO= -2 ⋅ 96500 ⋅ (0,816-(-0,32))= -219,25 kJ/mol

 Teoreticky by vzniklo 7,3 molů ATP.

 b) NADH + 2 [Fe(CN)6]3- → NAD+ + H+ + 2 [Fe(CN)6]4-

 ΔGO= -n ⋅ F ⋅ ΔEO= -2 ⋅ 96500 ⋅ (0,36-(-0,32)= -131,24 kJ/mol

 Teoreticky by vzniklo 4,4 molů ATP.

1. jantaran + 2 ADP + 1/2 O2 → fumaran + 2 ATP + H2O + 2P

 isocitrát + 7 ADP + 7P + O2 → jantaran + 2 CO2 + 7 ATP + 2 H2O

 jantaran + 5 ADP + 5P + O2 + H2O → oxalacetát + 5 ATP + 2 H2O

1. Antimycin je inhibitorem komplexu III, zasahuje v místě cytochromu bc1.
2. fumaran + 3 ADP + 3P + 1/2O2 → oxalacetát + 3 ATP + H2O

2-oxoglutarát + 6 ADP + 6P + O2 → fumaran + 6 ATP + CO2 + H2O

1. ΔGO= -n ⋅ F ⋅ ΔEO= -2 ⋅ 96500 ⋅ (0,03-(-0,32))= -67,55 kJ/mol

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

**I. FOTOSYNTÉZA**

1. souhrnná rovnice pro fotosystém I:

2 PSI\* (red) + NADP+ + H+ → 2 PSI (ox) + NADPH

souhrnná rovnice pro fotosystém II:

4 PSII (ox) + 2 H2O → 4 PSII (red) + O2 + 4 H+

souhrnná rovnice pro oba fotosystémy:

2 H2O + 2 NADP+ → O2 + 2H+ + 2 NADPH

temná fáze fotosyntézy:

3CO2 + 6NADPH + 6H+ + 9ATP → glyceradehydfosfát + 6NADP + 9ADP + 8P + 3H2O

1. 2 ferredoxin (red) + NADP + H+ → 2 ferredoxin (ox) + NADPH

 ΔGO= -21 kJ/mol

 ΔEO= 0,106 V

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

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

5. 2 fotosystém I (red) + NADP + H+ → 2 fotosystém I (ox) + NADPH

 ΔEONADP= -0,324 V

 základní stav:

 ΔGO= -n ⋅ F ⋅ ΔEO= -2 ⋅ 96500 ⋅ (-0,324-0,46)

 ΔGO= 151,312 kJ/mol= -R ⋅ T ⋅ ln([fot I (ox)]2 ⋅ [NADPH]/ [fot I (red)]2 ⋅ [NADP])

 [NADPH] / [NADP] = 2.995 ⋅ 10-27

 excitovaný stav:

 ΔGO= -n ⋅ F ⋅ ΔEO= -2 ⋅ 96500 ⋅ (-0,324-(-0,60))

 ΔGO= -53,268 kJ/mol= -R ⋅ T ⋅ lnK

 [fot I (ox)]2 ⋅ [NADPH]/ [fot I (red)]2 ⋅ [NADP]= 2,175 ⋅ 109

 [NADPH] / [NADP] = 2,175 ⋅ 109

6. 2 ferredoxin (red) + NADP + H+ → 2 ferredoxin (ox) + NADPH

 ΔGO= -n ⋅ F ⋅ ΔEO= -2 ⋅ 96500 ⋅ (-0,324-(-0,43))= -20,46 kJ/mol

 ΔG = ΔGO + R ⋅ T ⋅ ln ([ferr(ox)]2 ⋅ [NADPH]/[ferr(red)]2⋅ [NADP])

 ΔG = -20460 + 8,31 ⋅ 298 ⋅ ln (100)= -9056 J/mol…samovolný průběh

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

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

7. diuron zasahuje v místě komplexu b6f

1. Jedná se o zelené sirné bakterie (rod Chlorobium) patřící mezi obligátně fototrofní organismy. Jsou inhibovány vyšší tenzí O2.

rovnice fotosyntézy: 2H2S + CO2 → {CH2O} + H2O + 2S, kde {CH2O} je např.cukr

**J. NUKLEOVÉ KYSELINY**

1. A260=[AMP]⋅ ε260(AMP) + [GMP]⋅ ε260(GMP)

 A280=[AMP]⋅ ε280(AMP) + [GMP]⋅ ε280(GMP)

 [GMP]=3,07.10-5 mol/l, [AMP]=1,90.10-5 mol/l

4. RNA 321, DNA 309

5. a/ UpCpUpApGpA

 b/ Up+ CpUpApGpAp, Up+Cp+UpApGpAp, Up+Cp+Up+ApGpAp atd.

 c/ UpCpUpApG+pAp, UpCpUpA+pG+pAp, UpCpU+pA+pG+pAp atd.

 d/ UpCpUpA+pGpAp

 e/ UpCpU+pA+pG+pAp

6. fosfodiesteráza hadího jedu: 32pApCpTpTpA+pG, 32pApCpTpT+pA+pG, 32pApCpT+pT+pA+pG, 32pApC+pT+pT+pA+pG (poslední dinukleotid nechá nerozštěpený)

 deoxyribonukleáza II: 32pAp+CpTpTpApG, 32pApCp+TpTpApG, 32pApCpTp+TpApG, 32pApCpTpTp+ApG, 32pApCpTpTpAp+G a další

1. 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; 1,82.106 Da, 3,02.10-18 g

12. a) 1,43.1011 Da

 b) 2,32.108 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 5,25.106 Da, což je 8,72.10-18 g

 c) 2833 kodonů a tedy aminokyselin, což je 3,97.105 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 T**TG GAG CGG CGG nebo TTT **GAG ATC T**TA GAG CGG CGG

18. a)jednoduchá šroubovice

 b)G 19%, T 25%, A 33%, C 23%

 c)G 21%, T 29%, A 29%, C 21%

 d)nový řetězec DNA

19. frekvence kodonů:

 UUU 0,9.0,9.0,9= 72,9% Phe

 UUC 0,9.0,9.0,1= 8,1% Phe

 UCU 8,1% Ser

 CUU 8,1% Leu

 UCC 0,9% Ser

 CUC 0,9% Leu

 CCU 0,9% Pro

 CCC 0,1% Pro

 Po součtu dostáváváme teoretické aminokyselinové složení shodné s experimentálním.

1. 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.

1. strukturní gen: 750 nukleotidů (+ iniciační a terminační kodony)

serin je v aktivním centru

**K. REDOXNÍ REAKCE**

1. E=‑0,35 V
2. doleva, doprava, doleva, doprava
3. Při výpočtu ΔEO odečítá od redoxního potenciálu složky, která vystupuje na levé straně rovnice v oxidované podobě, redoxní potenciál složky, která je zde v podobě redukované.

 +29,7 kJ/mol, 6,13.10‑6

1. [laktát]/[pyruvát]=1

 ΔE0= E0/LAK- E0/NAD=-0,185-(-0,32)=0,135V

 ΔE0= (R⋅T/n⋅F) ⋅ ln([laktát]⋅[NAD+]/[pyruvát]⋅[NADH])

 [NAD+]/[NADH]=3,71⋅ 104

1. ΔE0= -0,32-(-0,031)= -0,351V

 ΔG0= 67,7 kJ/mol

 ΔG= ΔG0 + R⋅T⋅ ln ([fumaran]⋅[NADH]/[jantaran]⋅[NAD+])=+60,3 kJ/mol

1. ΔE0=0,104-(-0,32)= 0,424V

 ΔG0= -81,8 kJ/mol

 ΔG= ΔG0 + R⋅T⋅ ln ([UQH2]⋅[NAD+]/[UQ]⋅[NADH])= -68,7 kJ/mol

1. ΔE0= 0,03-(-0,58)= 0,61V

 ΔG0= -117,7 kJ/mol

 Reakce probíhá doprava.

1. ΔG0= -14,5 kJ.mol-1

 Reakce probíhá doprava.

1. ΔG0= -83 kJ.mol-1, 2-3 molekuly ATP
2. [alkohol]=(5/46,0829)/0,1= 1,0854mol/l

 ΔE0=0,123V

 ΔG0= -23,74 kJ/mol

 [NAD+]/[NADH+]=6,71

1. NAD+:

 ΔE0=0,26 V, ΔG0= -50,2 kJ/mol, ΔG= -61,6 kJ/mol

 FAD:

 ΔE0=0,58 V, ΔG0= 111,9 kJ/mol, ΔG= 100,5 kJ/mol