

Osnove biokemije

Seminar 6.

1

Rješenja zadaće 5.

1.	C	11.	D
2.	C	12.	C
3.	C	13.	C
4.	D	14.	C
5.	B	15.	A
6.	A	16.	B
7.	D	17.	B
8.	D	18.	B
9.	C	19.	C
10.	B	20.	D

2

1. Koji od navoda za ustaljeno stanje, kako to opisuje Michaelis-Mentenina jednačba, **nije** točan?
 - a) Brzina kojom nastaje enzim-supstrat kompleks (ES) jednaka je brzini razgradnje ES kompleksa.
 - b) Koncentracije ni enzima ni supstrata tijekom ustaljene enzimске reakcije značajno se ne mijenjaju.
 - c) Koncentracija ES kompleksa je konstanta tijekom reakcije.

2. V_m , maksimalna brzina enzimске reakcije je:
 - a) Brzina koja se dostiže kada su zauzeta sva aktivna mjesta enzima.
 - b) To je brzina koja ne ovisi o koncentraciji enzima.
 - c) To je brzina koja se opaža kod najveće koncentracije supstrata koja je korištena u eksperimentu.

3

3. K_M jednaka je K_d (konstanti disocijacije) enzim-supstrat kompleksa samo kada je:
 - a) $k_{-1} \ll k_2$;
 - b) $k_{-1} \gg k_2$;
 - c) $v = V_m/2$.

4. Da bi odredili k_2 , odnosno k_{cat} broj obrta (prometa) enzima, moramo:
 - a) Dijeliti V_m s 2;
 - b) Dijeliti v s V_m ;
 - c) Dijeliti V_m s ukupnom koncentracijom enzima.

4

5. Za enzime koji koriste dva supstrata, mehanizam djelovanja objašnjavamo sekvencijskim modelom ili modelom dvostruke zamjene (ping-pong). Što od navedenog **nije** točno?
- a) U sekvencijskom modelu nastaje trimerni kompleks enzima i oba supstrata dok to model dvostruke zamjene ne uključuje.
 - b) U sekvencijskom modelu reakcija može biti uređena ili nasumična obzirom koji se supstrat prvi veže dok u modelu dvostruke zamjene reakcija je uvijek uređena.
 - c) Sekvencijski model uvijek uključuje prijelazni aktivirani enzimski međuprodukt dok to model dvostruke zamjene ne uključuje.
6. Po čemu razlikujemo aktivnost enzima i alosteričkih proteina od enzima odnosno proteina koji nemaju alosterička svojstva?
- a) Zbog toga što alosterički proteini imaju više podjedinica;
 - b) Zbog toga što drugačije reagiraju s molekulama koje im nisu supstrati;
 - c) Zbog toga što drugačije reagiraju na različite koncentracije supstrata.

5

7. Utjecaj jednog supstrata na alosterički enzim koji dovodi do sigmoidne kinetičke krivulje ($v/[S]$) naziva se:
- a) Heterotropni efekt;
 - b) Homotropni efekt;
 - c) Efekt aktivnog mjesta.
8. Kakav će utjecaj, imati heterotropni faktor koji aktivira enzim, na sigmoidni oblik krivulje ($v/[S]$)?
- a) Krivulja će se pomaknuti u desno (prema većim vrijednostima supstrata);
 - b) Krivulja će se pomaknuti u lijevo (prema manjim vrijednostima supstrata);
 - c) Krivulja će postati sigmoidalnija (prvi dio krivulje će se smanjiti a drugi dio krivulje će se povećati)

6

9. Katalitička efikasnost najbolje se mjeri:

- a) Omjerom K_M/V_m ;
- b) Omjerom $V_m/[E_T]$;
- c) Omjerom k_{cat}/K_M .

10. Enzimu A $K_M=5 \times 10^{-3}$, a K_M enzima B $K_M= 5 \times 10^{-6}$. Koji je navod točan?

- a) Broj obrta (prometa) enzima A je veći od broja obrta enzima B.
- b) Supstrat enzima B čvršće se veže za enzim B nego što se to veže supstrat za enzim A.
- c) Enzim A je mitohondrijski oblik, a enzim B je citoplazmatski oblik istog enzima.

7

Zadatak 1.

Enzim ureaza povećava brzinu hidrolize uree kod $\text{pH} = 8,0$ pri $20\text{ }^\circ\text{C}$ za faktor od 10^{14} . Određena količina enzima u potpunosti hidrolizira zadanu količinu uree tijekom 5 minuta pri $20\text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 8,0$. Koliko dugo bi se zadana količina uree hidrolizirala kada enzim ne bi bio prisutan? (pretpostavka je da se obje reakcije odvijaju u sterilnim uvjetima tako da bakterije ne zagađaju ureu).

8

Zadatak 1.-rješenje

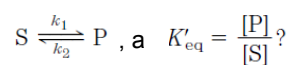
Vrijeme potrebno za hidrolizu uree kada ne bi bilo enzima:

$$= \frac{(5 \text{ min}) (10^{14})}{(60 \text{ min/h}) (24 \text{ h/dan}) (365 \text{ dan/godina})} = 9,5 \times 10^8 \text{ godina}$$

9

Zadatak 2.

Što će se od navedenog promijeniti ukoliko enzim katalizira jednostavnu reakciju:



- a) Smanjena K'_{eq} ;
- b) Povećana k_1 ;
- c) Povećana K'_{eq} ;
- d) Povećana ΔG^\ddagger ;
- e) Smanjena ΔG^\ddagger ;
- f) Negativnija $\Delta G'^\circ$;
- g) Povećana k_2 .

10

Zadatak 2.-rješenje

Promijeniti će se (b), (e) i (g).

Enzimi ne mijenjaju konstantu ravnoteže reakcije ali mijenjaju konstante brzina reakcije pa su zato odgovori (b) i (g) točni. Isto tako brzina reakcije se povećava u prisutnosti enzima a to je posljedica smanjenja energije aktivacije – odgovor (e).

11

Zadatak 3.

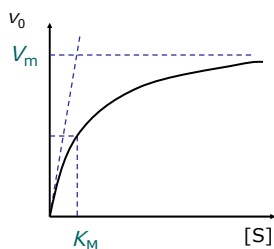
Skicirajte odgovarajuće dijagrame za katalizu enzimom koji slijedi Michaelis-Menteninu kinetiku :

- a) v_0 u ovisnosti o $[S]$
- b) v_0 u ovisnosti o $[E_0]$
- c) $[ES]$ u ovisnosti o t
- d) $[S]$ u ovisnosti o t
- e) $[P]$ u ovisnosti o t

ako su vrijednosti ostalih varijabli u svakom pojedinačnom slučaju konstantne.

12

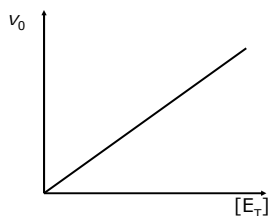
Rješenje:

a) v_0 u ovisnosti o $[S]$ 

Prikaz v_0 u ovisnosti o $[S]$ je, naravno, obični dijagram Michaelis-Menten.

13

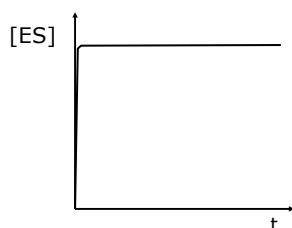
Rješenje:

b) v_0 u ovisnosti o $[E_T]$ 

Prisjetite se s predavanja da je $V_m = k_2[E_T]$. Ako se ostale varijable u jednačbi ne mijenjaju ($[S]$ konstantan, kao i fizički uvjeti reakcije), tada je v_0 proporcionalna V_m , pa tako i s $[E_T]$. Stoga je dijagram ovisnosti v_0 o $[E_T]$ pravac koji prolazi kroz ishodište (jer je logično pretpostaviti da se velika većina biokemijskih reakcija u odsutnosti enzima ($[E_T]=0$) ne odvija zamjetnom brzinom ($v_0=0$)).

14

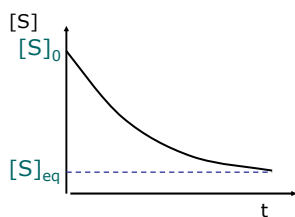
Rješenje:

c) $[ES]$ u ovisnosti o t 

Model Michaelis-Menten pretpostavlja da je reakcija katalizirana enzimom u *ustaljenom stanju*: brzina nastanka kompleksa ES je jednaka brzini njegova nestanka. Stoga se u uvjetima u kojima je ovaj model primjenjiv koncentracija $[ES]$ ne mijenja s vremenom. (Sam početak grafa prikazuje razdoblje potrebno za uspostavu ustaljene koncentracije $[ES]$, tzv. *predustaljeno stanje*. Trajanje ovog razdoblja je reda veličine ms, dok je trajanje ustaljenog stanja u većini slučajeva reda veličine sekundi ili minuta, ponekad i sati.)

15

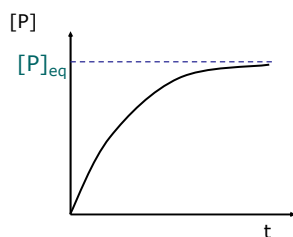
Rješenje:

d) $[S]$ u ovisnosti o t 

Na početku reakcije katalizirane enzimom ($t=0$) u reakcijskoj smjesi prisutna je početna koncentracija supstrata $[S]_0$. Teoretski, za $t \rightarrow \infty$ reakcija će se približavati ravnoteži, a koncentracija S nekoj ravnotežnoj koncentraciji $[S]_{eq}$. VAŽNO je uočiti da je model Michaelis-Menten u svom osnovnom obliku primjenjiv samo u onom vremenskom intervalu u kojem se koncentracija $[S]$ bitno ne mijenja (to je, naime, preduvjet da bude $[ES]=const.$). Drugim riječima, vremenska ljestvica na dijagramu lijevo je puno dulja nego na ostalim grafovima.

16

Rješenje:

e) $[P]$ u ovisnosti o t 

Na početku reakcije katalizirane enzimom ($t=0$) u reakcijskoj smjesi nema produkta ($[P]=0$). Za $t \rightarrow \infty$ reakcija će se približavati ravnoteži, a koncentracija P nekoj ravnotežnoj koncentraciji $[P]_{eq}$. Opet, VAŽNO je uočiti da je model Michaelis-Menten u svom osnovnom obliku primjenjiv samo u onom vremenskom intervalu u kojem je koncentracija $[P]$ dovoljno niska da ne dolazi do povratne reakcije (pretpostavka modela je $k_{-2}[P] \approx 0$).

17

Zadatak 4.

Za reakciju kataliziranu enzimom dobivene su sljedeće vrijednosti

$[S] / \text{mM}$	$v_0 / \text{mmol ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$
0,1	3,33
0,2	5,00
0,5	7,14
0,8	8,00
1,0	8,33
2,0	9,00

- Odredite K_M i V_m grafički po Lineweaveru i Burku.
- Uz pretpostavku da je enzim prisutan u koncentraciji $10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ izračunajte njegov obrtni (prometni) broj.

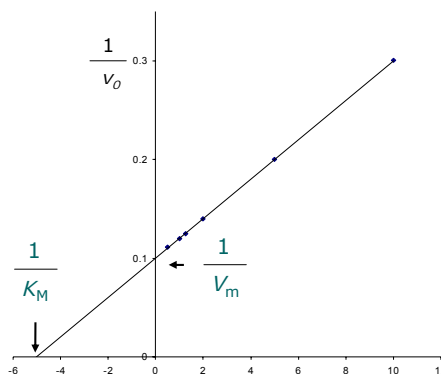
18

Rješenje zadatka 4:

- izračunati

$1/[S]$ · mM	$1/v_0$ · mmol ml ⁻¹ min ⁻¹
10,00	0,30
5,00	0,20
2,00	0,14
1,25	0,13
1,00	0,12
0,50	0,11

Iz grafa očitamo:
 $V_m = 10 \text{ mmol ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$
 $K_M = 0.2 \text{ mmol dm}^{-3}$



- iz $V_m = k_{cat}[E_T]$ računamo:

$$k_{cat} = \frac{V_m}{[E_T]} = \frac{10 \text{ mmol ml}^{-1} \text{ min}^{-1}}{10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}} = \frac{10 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}}{10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}} = 10^7 \text{ min}^{-1} = 1,7 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1} \quad \frac{1}{[S]}$$

19

Zadatak 5.

Za enzim koji slijedi Michaelis-Menteninu kinetiku izračunajte omjer $[S] / K_M$ potreban da bi brzina reakcije iznosila:

- $0.10 V_m$
- $0.25 V_m$
- $0.50 V_m$
- $0.99 V_m$

20

Rješenje zadatka 5a):

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

$$0,1 V_m = \frac{V_m[S]}{K_M + [S]}$$

$$0,1 K_M + 0,1 [S] = [S]$$

$$0,1 K_M = (1 - 0,1) [S]$$

$$\frac{[S]}{K_M} = \frac{0,1}{(1 - 0,1)}$$

- a) 0.10 V_m
- b) 0.25 V_m
- c) 0.50 V_m
- d) 0.99 V_m

$$a) \frac{[S]}{K_M} = 0,11$$

$$b) \frac{[S]}{K_M} = 0,33$$

$$c) \frac{[S]}{K_M} = 1$$

$$d) \frac{[S]}{K_M} = 99$$

21

Zadatak 6.

Enzim katalizira pretvorbu: $A \leftrightarrow B$.

Poznata je k_{cat} enzima koja iznosi 600 s^{-1} . Poznato je također da pri $[E_T] = 20 \text{ nmol dm}^{-3}$ i $[S] = 40 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ početna brzina reakcije $v = 9,6 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$. Izračunajte K_M enzima za supstrat A.

22

Zadatak 6.-rješenje

$$k_{\text{cat}} = 600 \text{ s}^{-1}$$

$$[E_{\text{T}}] = 20 \text{ nmol dm}^{-3}$$

$$[A] = 40 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$$

$$v = 9,6 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$K_{\text{M}} = ?$$

$$V_{\text{m}} = k_{\text{cat}} [E_{\text{T}}]$$

$$V_{\text{m}} \frac{[S]}{[S] + K_{\text{M}}} = k_{\text{cat}} [E_{\text{T}}] \frac{[S]}{[S] + K_{\text{M}}}$$

$$v = \frac{k_{\text{cat}} [E_{\text{T}}] [S]}{[S] + K_{\text{M}}}$$

$$K_{\text{M}} = \frac{k_{\text{cat}} [E_{\text{T}}] [S] - v [S]}{v} = 10 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$$

23

Zadatak 7.

Mnogi se izolirani enzimi denaturiraju ukoliko se inkubiraju pri 37 °C. Međutim ako se enzimi pri 37 °C inkubiraju sa supstratima, enzimi su katalitički aktivni. Objasnite ovaj paradoks!

24

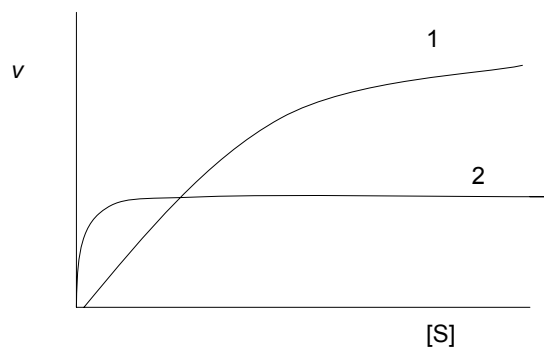
Zadatak 7.-rješenje

Trodimenzionalna struktura enzima stabilizira se interakcijama sa supstratima, reakcijskim međuproduktima i produktima te ove stabilizirajuće interakcije smanjuju termičku denaturaciju.

25

Zadatak 8.

Aminokiselina asparagin potrebna je za rast tumorskih stanica. Tretiranjem pacijenata s enzimom asparaginazom, jedan je od postupaka kemoterapije. Popratni dijagram pokazuje aktivnosti dva pripravka asparaginaze. Koji bi pripravak bio bolji kemoterapeutik?



26

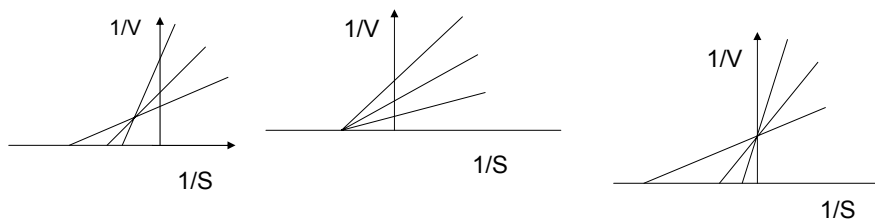
Zadatak 8.-rješenje

Pripravak 1. ima veću V_m , ali pripravak 2. ima veću aktivnost kod koncentracija supstrata koji su u okolišu. Kod koncentracija koje su u okolišu enzim 2. ima veću aktivnost budući da enzim 2. ima manju K_M za supstrat i za koncentracije koje su manje od K_{M1} , enzim 2. već postiže svoju V_m i razgrađuje asparagin konstantnom brzinom dok to enzim 1. još dugo neće moći postići.

27

Zadatak 9.

Napravljena je kinetika monosupstratnog enzima pri čemu su korištene tri različite koncentracije enzima a koncentracije istog supstrata u sva tri mjerenja bile su identične. Koji od navedenih dijagrama (Lineweaver –Burk) opisuje gore navedenu kinetiku?



28

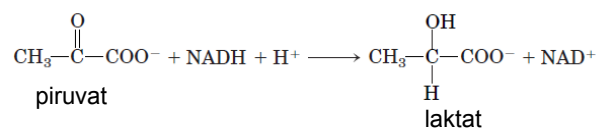
Zadatak 9.-rješenje

Srednji dijagram. Iđentičan je enzim pa su K_M vrijednosti jednake za tri različite koncentracije enzima. Kako je $V_m = k_2[E_T]$, jasno je da će i V_m za različite koncentracije biti različite.

29

Zadatak 10.

U mišiću, laktat dehidrogenaza katalizira reakciju:



NADH i NAD^+ su reducirani odnosno oksidirani oblici koenzima NAD. Otopina NADH apsorbira svjetlost pri 340 nm, dok otopina NAD^+ ne apsorbira svjetlost pri ovoj valnoj duljini. Apsorpcija svjetlosti NADH koristi se za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije NADH u otopini. Objasnite kako se ove karakteristike NADH mogu iskoristiti za kvantitativno određivanje aktivnosti laktat dehidrogenaze.

30

Zadatak 10.-rješenje

Brzina reakcije može se pratiti iz smanjenja apsorbancije NADH pri 340 nm (pretvorba NADH u NAD⁺). Potrebna su tri parametra kako bi se pripremio kvantitativni test za određivanje laktat dehidrogenaze:

- a) odrediti K_M ;
- b) izmjeriti početne brzine reakcije kada su poznate količine enzima zasićene s NADH odnosno s piruvatom;
- c) nacrtati graf – početna brzina u odnosu na [E] – graf treba prikazivati pravac, a nagib pravca je koncentracija laktat dehidrogenaze.