

Osnove biokemije

Seminar 7.a)

Rješenja zadaće 6.

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

1. Diizopropilfosfofluoridat (DIPF) inaktivira kimotripsin time što se kovalentno veže za serin 195. To se događa zbog toga što:
 - a) DIPF slični supstratu za kimotripsin i veže se u aktivno mjesto enzima kao kompetitivni inhibitor.
 - b) Serin 195 se nalazi u okolišu koji omogućava povećanu reaktivnost i reakciju s DIPF.
 - c) DIPF nasumce modificira sve serinske ostatke na proteinu i ukoliko ga se doda u dovoljnoj količini, serin u aktivnom mjestu vjerojatno će se modificirati.

2. Mehanizam djelovanja kimotripsina može se opisati kao proces koji se odvija u dva stupnja, odnosno kao reakcije acilacije i deacilacije. Brzo otpuštanje p-nitrofenilfosfata pomoću kimotripsina nastaje zbog toga što:
 - a) Brzina reakcije acilacije je sporija od brzine reakcije deacilacije.
 - b) Brzina reakcije acilacije je brža od brzine reakcije deacilacije.
 - c) Brzine reakcija acilacije i deacilacije su jednake.

3. Izolirali ste novu proteazu koja cijepa peptidnu vezu iza Asp i Glu. Na osnovu inaktivacije proteaze s DIPF pretpostavljate da proteaza koristi sličan mehanizam kao i kimotripsin. Razliku u specifičnosti cijepanja peptidnih veza možete objasniti kao:
 - a) U utoru (džepu) u koji se vezao DIPF nalaze se pozitivno nabijeni aminokiselinski ostaci.
 - b) U utoru (džepu) u koji se vezao DIPF nalaze se negativno nabijeni aminokiselinski ostaci.
 - c) Na proteinu je došlo do zamjene serina 195 s pozitivno nabijenom aminokiselinom.

4. TPCK inaktivira kimotripsin ali ne i tripsin zbog toga što:
 - a) TPCK slični supstratu za kimotripsin (ali ne i supstratu za tripsin) pa se zbog toga može vezati u aktivno mjesto kimotripsina i time modificirati His-57.
 - b) U aktivnom mjestu tripsina ne nalazi se His, te se TPCK ne može vezati.
 - c) TPCK je analogon prijelaznog stanja kimotripsina a ne tripsina.

5. Što od navedenog **nije** točno o kompetitivnim inhibitorima?

- a) Kompetitivni inhibitori nepovratno (ireverzibilno) inhibiraju enzim budući da kemijski modificiraju skupine u aktivnom mjestu enzima.
- b) Kompetitivni inhibitori često sličje supstratu enzima.
- c) Kompetitivna inhibicija može se nadvladati ukoliko se poveća koncentracija supstrata.

6. U aktivnom mjestu ugljične anhidraze nalazi se voda koja koordinira Zn(II) te je optimalna enzimaska aktivnost u ovom vodenom mediju oko pK_a 7. Smatra se da do promjene pK_a vode dolazi zbog vezanja vode na Zn (II). Što je od navedenog točno?

- a) pK_a vode oko 7 ukazuje da Zn(II) ne dovodi do ionizacije molekula vode (da molekula vode donira (gubi) ili prima protone).
- b) Zn(II) aktivira vodu tako što povisuje pK_a vode i time onemogućava da voda gubi protone.
- c) Zn(II) aktivira vodu tako što smanjuje pK_a vode i time olakšava da voda gubi protone.

7. Koja vrsta reverzibilnih inhibitora ukazuje da se V_m smanjuje a da K_M ostaje ista?

- a) Kompetitivni;
- b) Nekompetitivni;
- c) Akompetitivni.

8. Koja se vrsta inhibitora može vezati za enzim nakon što je već nastao ES kompleks?

- a) Kompetitivni;
- b) Nekompetitivni;
- c) Akompetitivni.

9. Koja je točna tvrdnja o utjecaju pH na enzime?

- a) Optimalna aktivnost pojedinog enzima je u uskom fiziološkom području.
- b) Razlog zašto enzimi imaju zvonoliku krivulju je taj što se enzimi pri ekstremnim pH vrijednostima denaturiraju.
- c) Pepsin, enzim probavnog trakta, ima optimalnu vrijednost pri pH 8.

10. Zašto penicilin, inhibitor biosinteze stijenke bakterija, nazivamo suicidalnim inhibitorom?

- a) U prisustvu penicilina, enzim transpeptidaza ne stvara kovalentne međuprodukte.
- b) Penicilin stvara međuprodukte koji inaktiviraju enzim.
- c) Penicilin selektivno uklanja metal koji služi kao ionski kofaktor metabolizma.

Zadatak 1.

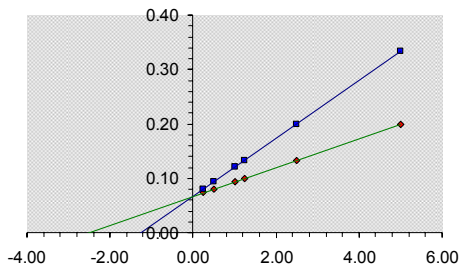
Za reakciju kataliziranu enzimom u odsutnosti i prisutnosti nekog inhibitora prikupljeni su sljedeći podaci:

- a) Koristeći Lineweaver-Burkov prikaz odredite tip inhibicije.
- b) Veže li se inhibitor na E, na kompleks ES ili na oba?

[S] / mM	v_0 / mmol ml⁻¹ min⁻¹	v_{0i} / mmol ml⁻¹ min⁻¹
0.2	5.0	3.0
0.4	7.5	5.0
0.8	10.0	7.5
1.0	10.7	8.3
2.0	12.5	10.7
4.0	13.6	12.5

Rješenje zadatka 1.:

$1/[S]$ mM	$1/v_0$ mmol ml ⁻¹ min ⁻¹	$1/v_{0i}$ mmol ml ⁻¹ min ⁻¹
5.00	0.20	0.33
2.50	0.13	0.20
1.25	0.10	0.13
1.00	0.09	0.12
0.50	0.08	0.09
0.25	0.07	0.08



$$V_{m_i} = V_m = 15 \text{ mmol ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

$$K_M = 0.4 \text{ mmol dm}^{-3}$$

$$K_{M_i} = 0.83 \text{ mmol dm}^{-3}$$

Riječ je o kompetitivnoj inhibiciji.

- b) Inhibitor se veže samo na E. Kompetitivni inhibitor se ne može vezati na ES, jer se veže u aktivno mjesto na isto mjesto kao i S.

Zadatak 2.

- a) Izračunajte K_i kompetitivnog inhibitora na temelju sljedećih podataka:

$$K_M = 6.7 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$$

$$V_m = 300 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$$

$$v_{0i} = 1.5 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$$

$$\text{pri } [I] = 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \text{ i}$$

$$[S] = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$$

- b) Izračunajte postotak inhibicije pri ovim uvjetima.

Rješenje zadatka 2.:

Kod kompetitivnog inhibitora:
$$K_{Mi} = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

iz čega izražavamo K_i kao:

$$K_i = \frac{[I]}{\frac{K_{Mi}}{K_M} - 1}$$

I zato, ako znamo izračunati K_{Mi} pri zadanim uvjetima, znamo izračunati i K_i . K_{Mi} se izračunava iz:

$$v_{0i} = \frac{V_m [S]}{K_{Mi} + [S]}$$

Rješenje zadatka 2.:

$$\begin{aligned} K_{Mi} &= \frac{V_m}{v_{0i}} [S] - [S] = [S] \left(\frac{V_m}{v_{0i}} - 1 \right) \\ &= 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \cdot \frac{300 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}}{1.5 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}} \\ &= \mathbf{3.98 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}} \end{aligned}$$

Ovako izračunati K_{Mi} uvrštamo u izraz za K_i koji smo izveli na početku:

$$\begin{aligned} K_i &= \frac{[I]}{\frac{K_{Mi}}{K_M} - 1} = \frac{10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}}{\frac{3.98 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}}{6.7 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}} - 1} \\ &= \mathbf{2.02 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}} \end{aligned}$$

Rješenje zadatka 2.:

b) Definicija:
$$\% \text{ inhibicije} = \left(1 - \frac{v_{0i}}{v_0} \right) \cdot 100 \%$$

U ovom zadatku brzina v_{0i} je zadana:

$$v_{0i} = 1.5 \mu \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$$

dok brzinu neinhibirane reakcije računamo iz jednadžbe Michaelis -Menten:

$$v_0 = \frac{V_m[S]}{K_M + [S]} = \frac{300 \mu \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}}{1.5 \mu \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}} = 8.7 \mu \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$$

Uvrštamo:

$$\% \text{ inhibicije} = \left(1 - \frac{v_{0i}}{v_0} \right) \cdot 100 \% = \frac{1.5 \mu \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}}{8.7 \mu \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}} \cdot 100 \% = \mathbf{82.8 \%}$$

Zadatak 3.

a) Kolika treba biti koncentracija [I] kompetitivnog inhibitora za postizanje 75% inhibicije pri:

$$\begin{aligned} [S] &= 1.5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} \\ K_M &= 2.9 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \\ K_I &= 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} \end{aligned}$$

b) Na koju se vrijednost treba povisiti koncentracija supstrata da bi se brzina povećala do početne neinhibirane vrijednosti?

Rješenje zadatka 3.:

Iz izraza za % inhibicije slijedi

$$1 - \frac{v_{0i}}{v_0} = 0.75 \quad \text{t j.} \quad \frac{v_{0i}}{v_0} = 0.25$$

(relativna brzina reakcije u prisutnosti inhibitora)

Budući da ne znamo V_m niti $V_{m'}$, ne možemo izračunati ni v_0 ni v_{0i} ; znamo samo njihov omjer, te moramo računati s njim:

$$\frac{v_{0i}}{v_0} = \frac{\cancel{V_m} [S]}{K_{M_i} + [S]} = \frac{K_M + [S]}{K_{M_i} + [S]} = \frac{K_M + [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]}$$

Iz ovog izraza treba izlučiti [I].

Rješenje zadatka 3.:

$$K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) = \frac{K_M + [S]}{\frac{v_{0i}}{v_0}} - [S]$$

$$\frac{K_M}{K_i} [I] = \frac{K_M + [S]}{\frac{v_{0i}}{v_0}} - [S] - K_M$$

$$= (K_M + [S]) \left(\frac{v_0}{v_{0i}} - 1 \right)$$

$$[I] = \frac{K_i}{K_M} (K_M + [S]) \left(\frac{v_0}{v_{0i}} - 1 \right)$$

$$= \frac{2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}}{2.9 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}} \cdot X$$

$$(2.9 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} + 1.5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}) (4 - 1)$$

$$= 3.7 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$$

Rješenje zadatka 3b:

$$\begin{aligned}
 [S]' &= \frac{K_{M_i}}{K_M} [S] \\
 &= \frac{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}{K_M} [S] \\
 &= \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) [S] \\
 &= 1 + \frac{3.7 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}}{2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}} \cdot 1.5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} \\
 &= \mathbf{2.93 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 v'_{0i} &= v_0 \\
 \frac{v_m [S]'}{K_{M_i} + [S]'} &= \frac{v_m [S]}{K_M + [S]} \\
 K_M [S]' + [S][S]' &= K_{M_i} [S] + [S][S]' \\
 K_M [S]' &= K_{M_i} [S]
 \end{aligned}$$

Zadatak 4.

Enzimu čiji K_M iznosi $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ dodan je kompetitivni inhibitor ($[I]=10 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $K_i = 7.5 \mu\text{mol dm}^{-3}$) pri koncentraciji supstrata $3 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Koliko puta treba povećati koncentraciju supstrata da bi se enzimski aktivnost vratila na prvotnu razinu?

Rješenje zadatka 4.:

$$K_M = 5 \mu\text{mol dm}^{-3} = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$$

$$[I] = 10 \mu\text{mol dm}^{-3} = 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$$

$$K_i = 7.5 \mu\text{mol dm}^{-3} = 7.5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$$

$$[S] = 3 \mu\text{mol dm}^{-3} = 3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$$

- Kod kompetitivnog inhibitora:

$$v'_{oi} = v_0$$

$$\frac{V_m [S]'}{K_{Mi} + [S]'} = \frac{V_m [S]}{K_M + [S]}$$

$$K_{Mi} = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Rješenje zadatka 4.:

$$K_M [S]' = K_{Mi} [S]$$

$$[S]' = \frac{K_{Mi}}{K_M} [S]$$

$$[S]' = \frac{K_M (1 + [I]/K_i)}{K_M} [S]$$

$$[S]' = (1 + 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} / 7.5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}) \times 3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$$

$$[S]' = 7 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$$

$$\frac{[S]'}{[S]} = \frac{7 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}}{3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}} = 2,33$$

$$K_M = 5 \mu\text{mol dm}^{-3} = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$$

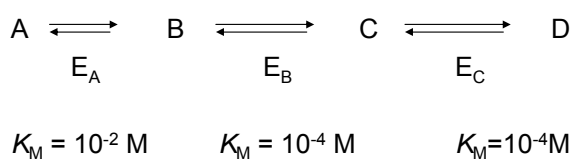
$$[I] = 10 \mu\text{mol dm}^{-3} = 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$$

$$K_i = 7.5 \mu\text{mol dm}^{-3} = 7.5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$$

$$[S] = 3 \mu\text{mol dm}^{-3} = 3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$$

Zadatak 5.

U pretvorbi A u D u jednom metaboličkom putu, sudjeluju enzimi E_A , E_B i E_C . Njihove K_M vrijednosti su naznačene na dijagramu. Ako su koncentracije svih reaktanata i produkata jednake, i iznose 10^{-4} mol dm^{-3} , a svi enzimi imaju gotovo jednake V_m , koji će biti odlučujući korak i zašto?



Rješenje zadatka 5.

Prvi korak je odlučujući, jer je E_A najsporiji, ima najveću K_M , a enzimi B i C djeluju kod optimalnih koncentracija (njihove koncentracije su jednake njihovim K_M vrijednostima), pa će im i brzine biti $\frac{1}{2} V_m$. E_A u ovim uvjetima djeluje brzinom od oko $10^{-2} V_m$.

Zadatak 6.

Za enzim koji slijedi Michalis-Menteninu kinetiku, koja će biti vrijednost V_m ako je $v = 1 \mu\text{mol min}^{-1}$ kod $[S] = 1/10 K_M$?

Rješenje zadatka 6.

- $V_m = 11 \mu\text{mol min}^{-1}$.

Zadatak 7.

Konstanta ravnoteže izomerizacije dihidrokisiaceton fosfata (DHAP) u gliceraldehid 3-fosfat (GAP), koja je određena pri standardnim uvjetima (298 K, pH=7) iznosi 0,0475. Izračunajte $\Delta G'^{\circ}$ ove reakcije.

Nadalje, izračunajte ΔG ove reakcije ako je početna koncentracija DHAP $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, a početna koncentracija

GAP $3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.

Rješenje zadatka 7.

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{\text{eq}} = -8,315 \times 298 \times \ln 0,0475 = 7,54 \text{ kJ mol}^{-1}.$$

$$\text{Za DHAP} \rightarrow \text{GAP}, K = [\text{GAP}]/[\text{DHAP}]$$

$$\begin{aligned} \Delta G &= \Delta G'^{\circ} + RT \ln [\text{GAP}]/[\text{DHAP}] = 7,54 + RT \ln (3 \times 10^{-6}/2 \times 10^{-4}) = \\ &= 7,54 - 10,41 = -2,87 \text{ kJ mol}^{-1}. \end{aligned}$$

Zadatak 8.

Hormon progesteron ima dvije ketonske skupine. Kod pH 7,0 koje bočne aminokiselinske skupine mogu stvarati vodikove veze s progesteronom?

Rješenje zadatka 8.

Kod pH 7 potencijalni donori protona su bočni ostaci: arginina, asparagina, glutamina, histidina, lizina, serina, treonina, triptofana, cisteina i tirozina.

Zadatak 9.

Aktivno mjesto lizozima sadrži dva bočna aminokiselinska ostatka koji su bitni za katalizu: Glu35 i Asp52. pK_a vrijednosti karboksilnih ostataka su 5,9 (glu35) i 4,5 (Asp52), a kod $pH = 5,2$ je optimalno područje djelovanja lizozima. Koji je ionski oblik (protonirani ili deprotonirani) bočnih ostataka Glu35 i Asp52 kod pH optimuma lizozima? Na koji način ionizacijska stanja ovih ostataka mogu objasniti promjenu aktivnosti enzima ovisnu o pH .

Zadatak 9.-rješenje

$pH = 5,2$ je srednja vrijednost pK_a bočnih ostataka tj. $(5,9 + 4,5)/2 = 5,2$. Bočna hidroksilna skupina Asp52, kojoj je $pK_a = 4,5$ nalazi se uglavnom u de-protoniranom obliku ($-COO^-$) dok se Glu35, kojoj je $pK_a = 5,9$ nalazi uglavnom u protoniranom ($-COOH$) obliku. Kod pH vrijednosti koje su niže od $pH = 5,2$, bočna skupina Asp52 se protonira i aktivnost se smanjuje. Slično, kod pH vrijednosti koje su veće od $pH = 5,2$, Glu35 se deprotonira te se aktivnost smanjuje. Krivulja aktivnosti enzima ovisna o pH (pH profil enzima) sugerira da je maksimalna aktivnost enzima pri pH vrijednosti koja je srednja vrijednost pK_a dvije karboksilne skupine pri kojem je Glu35 protonirana a Asp52 deprotonirana.

Zadatak 10.

Ispitivan je utjecaj pH na aktivnost enzima. U aktivnom mjestu enzima nalazi se ionizirana skupina koja mora biti negativno nabijena kako bi se provodilo vezanje supstrata kao i kataliza. pK_a ionizirane skupine je $pK_a = 6,0$. Supstrat je pozitivno nabijen pri svim pH vrijednostima.



+

H⁺

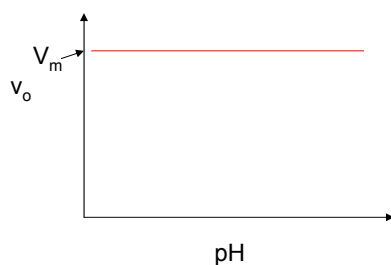
↕

EH

- Nacrtajte krivulju v_o u ovisnosti o pH kada je koncentracija supstrata daleko veća od K_M enzima.
- Nacrtajte krivulju v_o u ovisnosti o pH kada je koncentracija supstrata daleko manja od K_M enzima.
- Kod kojeg pH će brzina biti jednaka polovici maksimalne brzine?

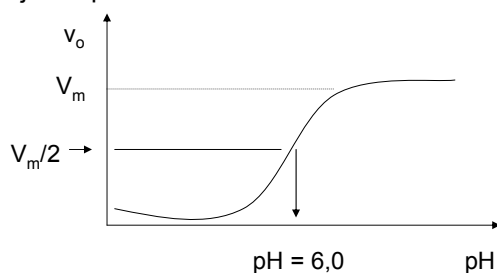
Zadatak 10.-rješenje (1)

- Kada je $[S^+]$ daleko veća od K_M , pH gotovo da neće imati utjecaj na aktivnost enzima jer će S^+ uvijek reagirati s E^- te će ES biti uvijek prisutan i gotovo konstantan.



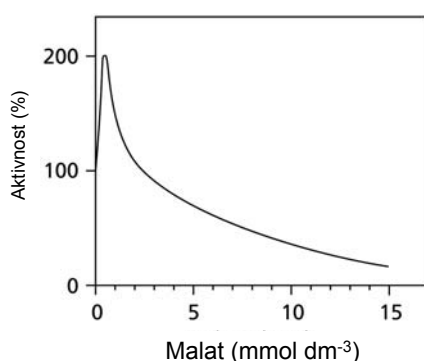
Zadatak 10.-rješenje (2)

b) Kada je $[S^+]$ daleko manja od K_M , krivulja v_o u ovisnosti o pH postaje titracijska krivulja ioniziranih skupina a aktivnost enzima je mjera titracije. Kod niskih pH vrijednosti, velika količina H^+ iona držat će enzim u EH^+ obliku, obliku u kojem je enzim neaktivan. Povećanjem pH, enzim će postepeno prelaziti u aktivni E^- oblik. Kod visokog pH, cjelokupna količina enzima će biti u aktivnom E^- obliku.



c) Srednja vrijednost brzine, između neaktivnog oblika i maksimalno aktivnog oblika jednaka je pK_a vrijednosti ionizirane skupine, odnosno $pH = 6,0$.

Zadatak 11.



Aspartat transkarbomolaza (ATCaza) je alosterički enzim sa šest katalitičkih i šest regulacijskih podjedinica. Enzim se nalazi u dvije konformacije, jednoj sa vrlo malom enzimskom aktivnosti, te drugoj, u kojoj enzim ima veliku enzimsku aktivnost. Kada nema supstrata, enzim je u konformaciji koja ima malu enzimsku aktivnost. Malat je inhibitor ATCaze i veže se u aktivno mjesto supstrata, tj. aspartata. Vrlo specifičan i neuobičajen efekt malata se opaža kada se aktivnost ATCaze mjeri pri malim koncentracijama malata – pri malim koncentracijama malata dolazi do porasta aktivnosti ATCaze, a aktivnost enzima se smanjuje kod viših koncentracija malata.

- Zbog čega malat, dobar inhibitor ATCaze, može povećati aktivnost enzima pri niskim koncentracijama?
- Da li će se ovaj efekt opažati kada se aktivnost enzima prati pri visokim koncentracijama aspartata?

Zadatak 11.-rješenje

Vežanje aspartata pomiče konformaciju ATCaze iz oblika (T) s malom enzimskom aktivnosti u konformaciju u kojoj enzim ima veliku enzimsku aktivnost (R). Kod malih koncentracija aspartata, neće se cjelokupna konformacija enzima pretvoriti u konformaciju u kojoj ATCaza ima maksimalnu enzimsku aktivnost. Neobičajeni efekt malata događa se zbog toga što se vezanjem malata završava konformacijski prijelaz enzima u konformaciju u kojoj je enzim u aktivnom obliku. U prisutnosti male količine malata povećava se broj aktivnih mjesta u konformaciji koja ima visoku enzimsku aktivnost te dolazi do ukupnog porasta enzimске aktivnosti.

Ovaj neobičajeni efekt malata se ne opaža kod visoke koncentracije aspartata budući da je ATCaza već prešla u oblik (konformaciju) sa velikom enzimskom aktivnosti. U ovim uvjetima, svaka molekula malata u aktivnom mjestu enzima smanjuje broj aspartata u aktivnom mjestu enzima, te time, dolazi do smanjenja aktivnosti ATCaze.