

Biokemija : Zbirka zadataka

Teparić, Renata; Stuparević, Igor

Authored book / Autorska knjiga

Publication status / Verzija rada: **Published version / Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

Publication year / Godina izdavanja: **2024**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:202826>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



PRIRUČNICI SVEUČILIŠTA U ZAGREBU PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKOG
FAKULTETA

Manualia Universitatis studiorum Zagrebiensis – Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu

BIOKEMIJA

Zbirka zadataka

Prof.dr.sc. Renata Teparić

Izv.prof.dr.sc. Igor Stuparević



Zagreb, 2024.



- Izdavač** Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6, Zagreb
- Za izdavača** Jelena Viličić, dipl. bibl.
- Autori** Prof.dr.sc. Renata Teparić
Izv.prof.dr.sc. Igor Stuparević
- Lektor:** Jelena Crnek, prof. hrvatskog jezika i književnosti
- Recenzenti:** Prof.dr.sc. Irena Landeka Jurčević
Prof.dr.sc. Ivica Strelec
- Vrsta djela** Priručnik
Objavljivanje je odobrio Senat Sveučilišta u Zagrebu na 3. redovitoj sjednici održanoj 19. prosinca 2023. (Klasa: 032-01/23-02/36; Urbroj: 251-25-07-01/2-23-4)
- Vrsta građe** e-knjiga
- Licencije** Slobodan pristup. Sva prava pridržana.

Virtualna zbirka

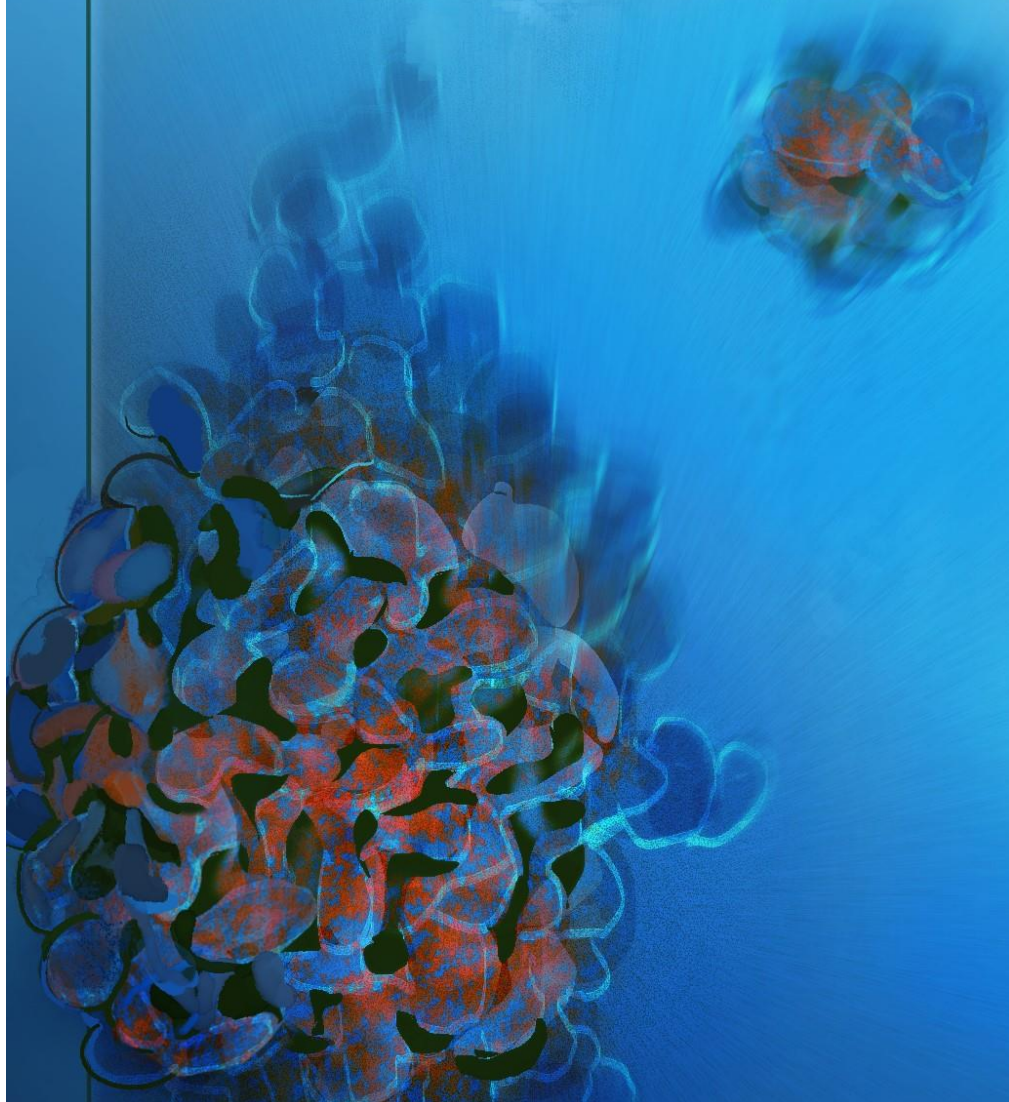
Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Biotehničko područje

Manualia Universitatis studiorum Zagrebiensis – Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu

ISBN: 978-953-6893-21-8

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET



Biokemija

ZBIRKA ZADATAKA

PROF. DR. SC. RENATA TEPARIĆ
IZV. PROF. DR. SC. IGOR STUPAREVIĆ



Dragi čitatelji,

S velikim zadovoljstvom vam predstavljamo Zbirku zadataka iz biokemije, koja je namijenjena prvenstveno studentima Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, ali i svim studentima Sveučilišta u Zagrebu i studentima ostalih hrvatskih sveučilišta i veleučilišta koji u okviru svojih studija imaju ovaj predmet, kao i svima ostalima koji žele produbiti svoje razumijevanje ove fascinantne znanosti.

Ova zbirka zadataka osmišljena je kao dodatni materijal za učenje koji će vam pružiti priliku da testirate svoje znanje i razumijevanje biokemije. U njoj ćete pronaći različite zadatke koji pokrivaju širok spektar tema, počevši od strukture i funkcije različitih biomolekula, procesa prijenosa informacija u stanicama, strukture i svojstava enzima, enzimske kinetike, metoda izolacije i pročišćavanja proteina, do osnovnih metaboličkih puteva i načina njihove regulacije i povezivanja u stanični metabolizam. Osim toga, zbirka obuhvaća zadatke različite težine, od jednostavnijih kojima se provjerava znanje osnovnih pojmova i općih koncepata do složenijih problemskih zadataka za čije rješavanje je potrebno povezivanje i razumijevanje naučenih činjenica i koncepata.

Prije pristupanja rješavanju zadataka prikazanih u ovoj Zbirci nužno je proučiti materijale koji su obvezna literatura za pojedini studij, obzirom da ova Zbirka nije zamišljena kao osnovni već kao dodatni materijal za učenje. Popis nekoliko na tržištu prisutnih udžbenika biokemije na visokoškolskoj razini koje se preporučuje koristiti u ovu svrhu dan je na kraju Zbirke. U samoj Zbirci je na početku svakog poglavlja dan kratki teoretski uvod nakon kojeg slijedi nekoliko primjera zadataka koji su riješeni uz detaljan prikaz i objašnjenje postupka rješavanja, te potom niz zadataka za vježbanje, čija su rješenja dana na kraju Zbirke. Nadamo se da će vam ova Zbirka pomoći u boljem razumijevanju koncepata i principa biokemije, te u razvijanju analitičkih sposobnosti i kritičkog razmišljanja, što su ključne vještine za primjenu biokemije u različitim područjima rada i istraživanja.

Biokemija je znanost koja se neprestano razvija, a nova otkrića do kojih istraživači u ovom području dolaze kontinuirano mijenjaju i produbljuju naše razumijevanje života i otvaraju mogućnosti za razvoj i poboljšavanje različitih tehnologija. Nadamo se da će ova Zbirka zadataka biti korisna za sve one koji žele u budućnosti doprinijeti istraživanju procesa koji se odvijaju unutar živih stanica i koji će rezultirati daljnjim razvojem tehnologija proizvodnje hrane, biogoriva, kemikalija i lijekova, novih metoda dijagnosticiranja i liječenja različitih bolesti kao i zaštiti okoliša u kojem živimo.

prof.dr.sc. Renata Teparić

izv.prof.dr.sc. Igor Stuparević

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| SADRŽAJ | 1 |
| 1. AMINOKISELINE I STRUKTURA PROTEINA | 4 |
| 1.1. Disocijacija funkcijskih skupina aminokiselina | 4 |
| Primjeri zadataka – disocijacija grupa i titracijske krivulje | 6 |
| Zadatci za vježbu – disocijacija aminokiselinskih grupa i neto naboj molekula | 14 |
| Zadatci za vježbu – titracijske krivulje | 16 |
| 1.2. Pufferi | 17 |
| Primjeri zadataka – pufferi | 17 |
| Zadatci za vježbu – pufferi | 21 |
| 2. STRUKTURA I SVOJSTVA PROTEINA | 22 |
| 2.1. Nekovalentne interakcije u biološkim sustavima | 22 |
| 2.2. Razine strukture proteina | 24 |
| Primjeri zadataka – struktura proteina | 25 |
| Zadatci za vježbu – struktura proteina | 27 |
| 2.3. Svojstva proteina – topljivost | 28 |
| Primjeri zadataka – topljivost proteina | 29 |
| Zadatci za vježbu – topljivost proteina | 32 |
| 3. ENZIMSKA KINETIKA | 33 |
| 3.1. Enzimska kinetika – brzina enzimskih reakcija | 33 |
| Primjeri zadataka – enzimska kinetika | 36 |
| Zadatci za vježbu – enzimska kinetika | 42 |
| 3.2. Enzimska kinetika – tipovi inhibicije | 44 |
| Primjeri zadataka – tipovi inhibicije | 46 |
| Zadatci za vježbu – tipovi inhibicije | 48 |
| 4. PROČIŠĆAVANJE PROTEINA | 50 |
| Primjeri zadataka – pročišćavanje proteina | 54 |
| Zadatci za vježbu – pročišćavanje proteina | 58 |
| 5. REPLIKACIJA, TRANSKRIPCIJA I TRANSLACIJA | 60 |
| Primjeri zadataka - replikacija, transkripcija i translacija | 63 |
| Zadatci za vježbu - replikacija, transkripcija i translacija | 68 |
| 6. BIOKEMIJSKA TERMODINAMIKA | 70 |
| 6.1. Promjena slobodne energije (ΔG) u enzimskim reakcijama | 70 |
| Primjeri zadataka – ΔG^0 u enzimskim reakcijama | 72 |
| Zadatci za vježbu – ΔG^0 u enzimskim reakcijama | 74 |
| 6.2. Redoks-potencijal i promjena slobodne energije u enzimskim reakcijama | 76 |
| Primjeri zadataka - redoks-potencijal i promjena slobodne energije | 77 |
| Zadatci za vježbu - redoks-potencijal i promjena slobodne energije | 80 |

| | |
|---|-----|
| 7. OKSIDACIJSKA FOSFORILACIJA | 81 |
| Primjeri zadataka – oksidacijska fosforilacija | 83 |
| 8. GLIKOLIZA | 85 |
| Primjeri zadataka – glikoliza | 87 |
| Zadatci za vježbu – glikoliza | 89 |
| 9. KOMPLEKS PIRUVAT DEHIDROGENAZE | 91 |
| Primjeri zadataka – kompleks piruvat dehidrogenaze | 91 |
| 10. CIKLUS LIMUNSKKE KISELINE | 93 |
| Primjeri zadataka – ciklus limunske kiseline | 93 |
| Zadatci za vježbu – ciklus limunske kiseline | 96 |
| 11. GLUKONEOGENEZA | 98 |
| Primjeri zadataka - glukoneogeneza | 98 |
| Zadatci za vježbu - glukoneogeneza | 102 |
| 12. GLIOKSILATNI CIKLUS | 103 |
| Primjeri zadataka – glioksilatni ciklus | 103 |
| Zadatci za vježbu – glioksilatni ciklus | 106 |
| 13. PUT PENTOZA-FOSFATA | 108 |
| Primjeri zadataka – put pentoza-fosfata | 109 |
| Zadatci za vježbu – put pentoza-fosfata | 113 |
| 14. FOTOSINTEZA | 115 |
| Primjeri zadataka - fotosinteza | 117 |
| Zadatci za vježbu – fotosinteza | 119 |
| 15. GLIKOGEN | 120 |
| Primjeri zadataka - glikogen | 122 |
| Zadatci za vježbu – glikogen | 124 |
| 16. METABOLIZAM MASNIH KISELINA | 125 |
| 16.1. Razgradnja masnih kiselina | 125 |
| Primjeri zadataka – razgradnja masnih kiselina | 126 |
| 16.2. Sinteza masnih kiselina | 132 |
| Primjeri zadataka – sinteza masnih kiselina | 132 |
| Zadatci za vježbu – metabolizam masnih kiselina | 135 |
| 17. METABOLIZAM AMINOKISELINA I UREA CIKLUS | 138 |
| Primjeri zadataka – metabolizam aminokiselina i urea ciklus | 138 |
| Zadatci za vježbu – metabolizam aminokiselina i urea ciklus | 141 |
| 18. RJEŠENJA ZADATAKA ZA VJEŽBU | 143 |
| Zadatci za vježbu – disocijacija aminokiselinskih grupa i neto naboj molekula | 143 |
| Zadatci za vježbu – titracijske krivulje | 143 |
| Zadatci za vježbu – puferi | 143 |
| Zadatci za vježbu – struktura proteina | 144 |

| | |
|---|-----|
| Zadatci za vježbu – topljivost proteina..... | 144 |
| Zadatci za vježbu – enzimska kinetika..... | 145 |
| Zadatci za vježbu – tipovi inhibicije..... | 145 |
| Zadatci za vježbu – pročišćavanje proteina..... | 145 |
| Zadatci za vježbu – replikacija, transkripcija i translacija..... | 146 |
| Zadatci za vježbu – ΔG^0 u enzimskim reakcijama..... | 146 |
| Zadatci za vježbu – redoks-potencijal i promjena slobodne energije..... | 147 |
| Zadatci za vježbu – glikoliza..... | 147 |
| Zadatci za vježbu – ciklus limunske kiseline..... | 148 |
| Zadatci za vježbu – glukoneogeneza..... | 149 |
| Zadatci za vježbu – glioksilatni ciklus..... | 150 |
| Zadatci za vježbu – put pentoza-fosfata..... | 151 |
| Zadatci za vježbu – fotosinteza..... | 151 |
| Zadatci za vježbu – glikogen..... | 152 |
| Zadatci za vježbu – metabolizam masnih kiselina..... | 153 |
| Zadatci za vježbu – metabolizam aminokiselina i urea ciklus..... | 154 |
| POPIS LITERATURE..... | 156 |

1. AMINOKISELINE I STRUKTURA PROTEINA

1.1. Disocijacija funkcijskih skupina aminokiselina

Pojedine aminokiselinske skupine, kao i funkcijske skupine ostalih organskih i anorganskih kiselina, imaju sposobnost primanja i otpuštanja protona ovisno o pH okolnog medija. Ravnoteža reakcije disocijacije neke skupine definirana je konstantom disocijacije K . U jako kiselom mediju (ispod pH 1) sve aminokiselinske skupine su protonirane. S porastom pH smanjuje se koncentracija H^+ iona u otopini pa počinju disocirati skupine koje imaju nisku pK vrijednost. pK je negativni logaritam konstante disocijacije skupine, stoga manji pK znači veću konstantu disocijacije, tj. do disocijacije skupine dolazi pri nižem pH. Kisele skupine imaju niže vrijednosti pK, tj. lakše otpuštaju protone. Prosječna vrijednost pK za α -karboksilnu skupinu svih aminokiselina je 2, a za karboksilne skupine u pobočnim ograncima aspartata i glutamata 4. Kad se pH približava pK vrijednosti pojedine skupine ona počinje otpuštati protone (disocirati) i postepeno prelazi iz protoniranog u disocirani oblik. Na vrijednost pK utječe i mikrookolina u kojoj se skupina nalazi. Ako mikrookolina potiče disocijaciju skupine njen pK se smanjuje, a ako mikrookolina otežava disocijaciju skupine njen pK se povećava. Stoga u različitim molekulama proteina vrijednosti pK za pojedinu aminokiselinsku skupinu variraju ovisno o mikrookolini. Kisele skupine su u protoniranom obliku bez naboja ($-COOH$), a u disociranom obliku imaju negativni naboj ($-COO^-$). Bazične skupine su u protoniranom obliku pozitivno nabijene (npr. $-NH_3^+$), a u disociranom obliku nemaju naboja (npr. $-NH_2$). Bazične skupine teže otpuštaju protone tj. imaju manju konstantu disocijacije pa su im pK vrijednosti veće i otpuštaju protone tek kod nižih koncentracija H^+ u okolnom mediju. Tako je pK pobočnog ogranka histidina 6 ako je histidin slobodan u otopini, dok se zbog utjecaja mikrookoline povećava na 6,8 kada se histidin nalazi vezan unutar molekule proteina. Prosječna vrijednost pK pobočnog ogranka lizina je 10,5, pobočnog ogranka arginina 12,5, a α -amino skupine 9,5. Osim pobočnih ogrankova ovih aminokiselina disocirati mogu još i pobočni ogranci cisteina (pK = 8,3) i tirozina (pK = 10,9). Iako pobočni ogranci cisteina i tirozina imaju visoke pK vrijednosti, po čemu su sličniji bazičnim grupama, oni su u protoniranom obliku bez naboja, a u disociranom obliku imaju negativni naboj.

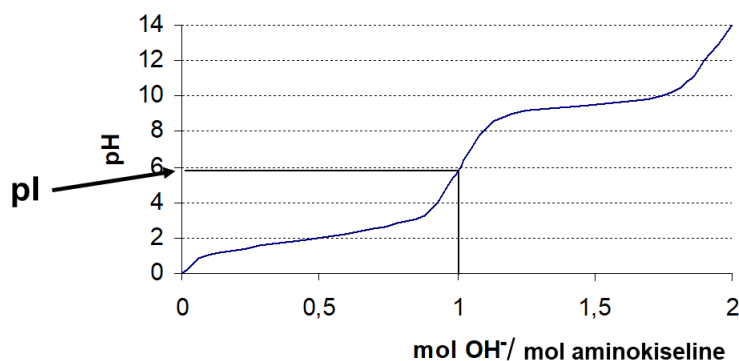
Zbog sposobnosti disocijacije/protoniranja skupina unutar molekula aminokiselina, naboj aminokiselina se mijenja ovisno o pH okoline. Sve aminokiseline imaju najmanje dvije skupine koje mogu disocirati (α -karboksilnu i α -amino skupinu). Ako se radi o aminokiselini koja u pobočnom ogranku ima skupinu koja ne može disocirati, onda se njen neto naboj mijenja

od +1 u jako kiselom mediju (nenabijena α -karboksilna, pozitivno nabijena α -amino skupina), preko neto naboja 0 (negativno nabijena α -karboksilna, pozitivno nabijena α -amino skupina) do neto naboja -1 (negativno nabijena α -karboksilna, nenabijena α -amino skupina) u bazičnom mediju. Koliki će udio pojedine skupine kod nekog pH biti u disociranom ili protoniranom obliku može se izračunati pomoću Handerson-Hasselbalchove jednadžbe.

$$pH = pK + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Ova jednadžba omogućuje da kod bilo kojeg pH izračunamo koliki je omjer protoniranog i disociranog oblika neke skupine ako znamo njen pK, odnosno koliki treba biti pH otopine da bismo postigli željeni omjer protoniranog i disociranog oblika te skupine. Iz jednadžbe proizlazi da u slučaju kada je pH manji od pK vrijednosti prevladava protonirani oblik skupine, kada je pH jednak pK onda je 50 % skupine protonirano, a 50 % disocirano, dok pri pH većem od pK prevladava disocirani oblik skupine. Iz jednadžbe se također može vidjeti da ako je pH za jednu jedinicu manji od pK onda je 90 % skupine u protoniranom obliku, a ako je pH za 2 jedinice manji od pK onda je 99 % skupine u protoniranom obliku. Ako je pH za jednu jedinicu veći od pK onda je 90 % skupine u disociranom obliku, a ako je pH za 2 jedinice veći od pK onda je 99 % skupine u disociranom obliku.

Protoniranje/disociranje aminokiselinskih skupina možemo pratiti i putem titracijske krivulje (Slika 1.). Titracijska krivulja se uvijek odnosi na jedan mol titrirane molekule (aminokiseline, peptida, proteina...) i pokazuje promjenu pH u ovisnosti o omjeru molova dodane kiseline ili lužine po molu titrirane molekule.



Slika 1. Titracijska krivulja nepolarne ili polarne nenabijene aminokiseline

Iz titracijske krivulje je vidljivo da dodatkom lužine pH naglo raste dok se ne približi pK vrijednosti pojedine skupine koja može disocirati/protonirati, a zatim stagnira sve dok ta skupina otpušta protone jer dolazi do neutralizacije dodanih OH⁻ s otpuštenim H⁺ ionima. Nakon što skupina otpusti sve svoje protone (prijede u potpuno disocirani oblik), s daljnjim dodatkom OH⁻ iona pH nastavlja naglo rasti dok se ne približi vrijednosti pK sljedeće skupine koja može disocirati. Drugim riječima, skupina koja može disocirati/protonirati djeluje puferski u pH području bliskom njenoj pK vrijednosti. Iz krivulje je također vidljivo da za potpunu disocijaciju neke skupine treba dodati 1 mol OH⁻ iona po jednom molu te skupine, odnosno da za disocijaciju 50 % te skupine treba dodati 0,5 mola OH⁻ iona po molu skupine. Kada je 50 % skupine u disociranom obliku pH je jednak pK vrijednosti te skupine.

Iz ove krivulje se može očitati i kolika je vrijednost izoelektrične točke (pI) molekule koju titriramo. Izoelektrična točka je pH kod kojeg je ukupni naboj molekule jednak nuli, tj. molekula ima jednak broj pozitivnih i negativnih naboja i električki je neutralna. Kod aminokiselina koje u pobočnom ogranku nemaju grupu koja može disocirati, izoelektrični oblik se postiže kada je α-karboksilna skupina potpuno disocirana, a α-amino skupina još nije počela disocirati. Vrijednost pI se izračunava kao aritmetička sredina pK vrijednosti ovih dviju skupina, jer je pri tom pH najveći mogući udio α-karboksilne skupine disociran, a istovremeno najveći mogući udio α-amino skupina protoniran.

Kod aminokiselina koje i u pobočnom ogranku imaju skupine koje mogu disocirati, kao i kod peptida koji imaju veći broj skupina koje mogu disocirati, vrijednost pI se izračunava kao aritmetička sredina pK vrijednosti skupine koja svojom disocijacijom prevodi ionski oblik molekule neto naboja +1 u izoelektrični oblik i pK vrijednosti skupine koja svojom disocijacijom prevodi izoelektrični oblik molekule u ionski oblik neto naboja -1.

Primjeri zadataka – disocijacija grupa i titracijske krivulje

1. primjer

Kolika treba biti vrijednost pH otopine histidina da 75 % pobočnih ogranaka histidina bude u protoniranom obliku?

Rješenje:

Vrijednost pH potrebnu da bismo dobili željeni omjer protoniranog i disociranog oblika pobočnog ogranaka histidina možemo izračunati pomoću Handerson-Hasselbalchove jednadžbe.

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{[\text{C}_{\text{dis.}}]}{[\text{C}_{\text{prot.}}]}$$

Disocirani i protonirani oblik skupine u pobočnom ogranku čine zajedno 100 %, tj. ako je 75 % (0,75) skupine protonirano onda je 25 % (0,25) skupine disocirano.

Kada u jednadžbu uvrstimo sve poznate vrijednosti dobivamo sljedeće:

$$\text{pH} = 6 + \log \frac{0,25}{0,75}$$

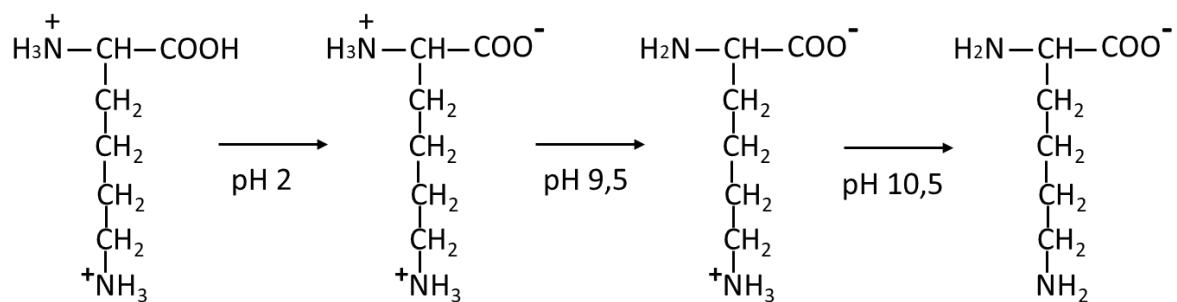
$$\text{pH} = 5,52$$

75 % pobočnih ogrankaka histidina bit će u protoniranom obliku pri pH = 5,52.

2. primjer

Napišite strukturnom formulom aminokiselinu lizin u svim mogućim ionskim oblicima i naznačite raspon pH kod kojeg će prevladavati svaki od oblika.

Rješenje:



Ionski oblik neto naboja +2 prevladavat će kod pH < 2, dok će pri pH = 2 50 % aminokiseline imati neto naboj +2, a 50 % naboj +1.

Ionski oblik neto naboja +1 prevladavat će kod 2 < pH < 9,5, dok će pri pH = 9,5 50 % aminokiseline imati neto naboj +1, a 50 % će biti u izoelektričnom obliku.

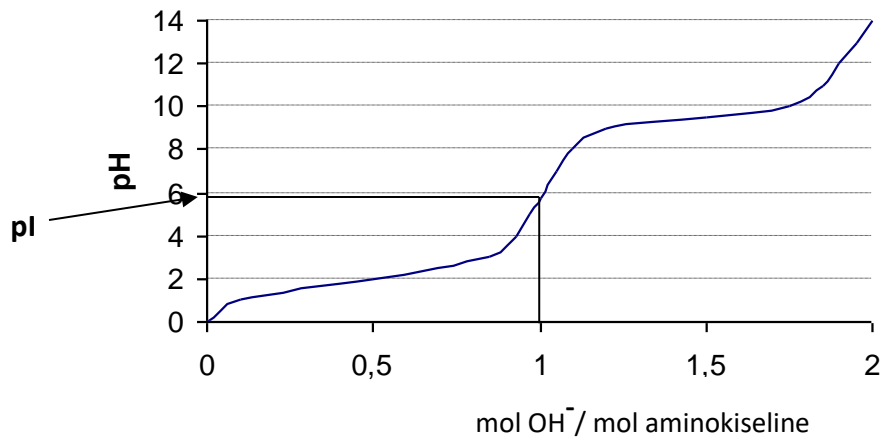
Izoelektrični oblik će prevladavati kod 9,5 < pH < 10,5, dok će pri pH = 10,5 50 % aminokiseline imati neto naboj 0, a 50 % naboj -1.

Ionski oblik neto naboja -1 prevladavat će kod pH > 10,5.

3. primjer

Nacrtajte titracijsku krivulju alanina te izračunajte njegovu pI točku i označite je na krivulji.

Rješenje:



$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

$$pI = \frac{2 + 9,5}{2}$$

$$pI = 5,75$$

Izoelektrični oblik alanina dobit će se kada na jedan mol potpuno protoniranog oblika alanina dodamo jedan mol OH⁻ iona. Pri tom pH će α-karboksilna skupina biti potpuno disocirana, a α-amino skupina još neće početi disocirati pa će aminokiselina imati jednu negativno i jednu pozitivno nabijenu skupinu i bit će električki neutralna. Vrijednost pI je aritmetička sredina pK vrijednosti ovih dviju skupina (pK skupine koja svojom disocijacijom prevodi aminokiselinu iz ionskog oblika neto naboja +1 u izoelektrični oblik i pK skupine koja svojom disocijacijom prevodi izoelektrični oblik u ionskog oblika neto naboja -1).

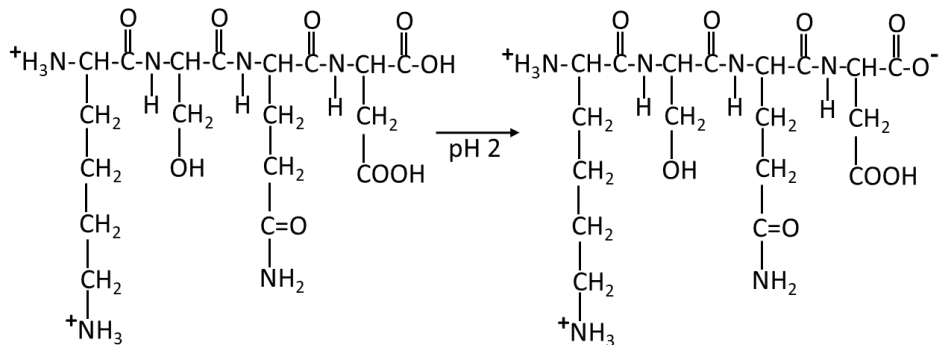
4. primjer

Nacrtajte titracijsku krivulju peptida Lys-Ser-Gln-Asp i izračunajte koliki volumen 1M otopine NaOH treba dodati u 100 mL 0,05 M otopine ovog tetrapeptida da bi peptid u otopini imao neto naboj -1 ako se kreće od:

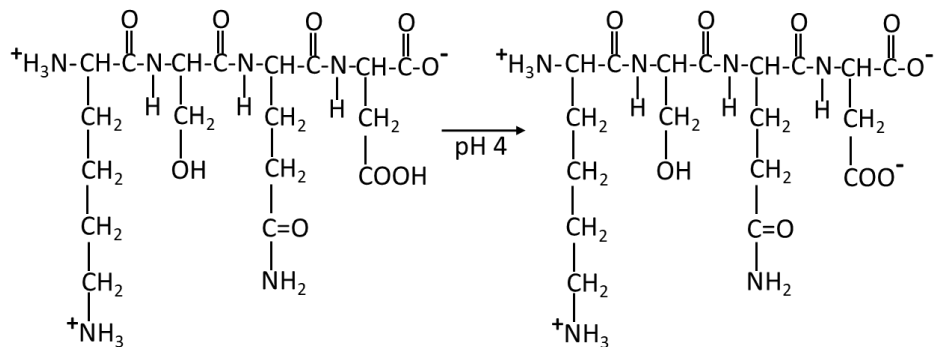
- pH jednakog pI ovog tetrapeptida
- pH pri kojem je tetrapeptid u potpuno protoniranom obliku.

Rješenje:

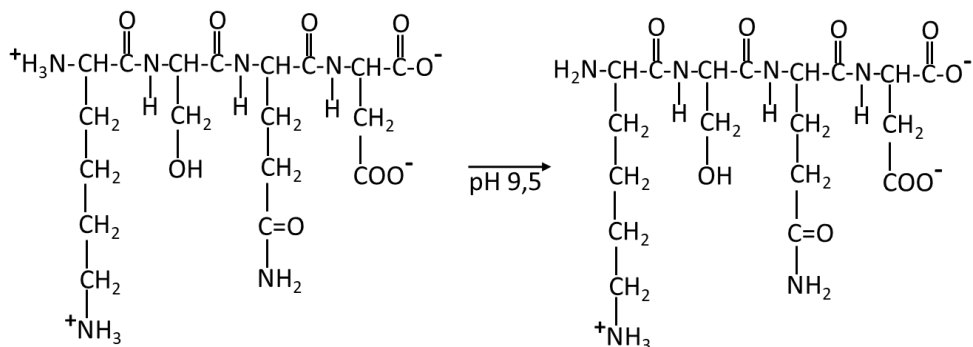
Da bismo nacrtali titracijsku krivulju moramo znati kako će se mijenjati ionski oblici ovog peptida sa promjenom pH otopine, počevši od potpuno protoniranog oblika peptida.



Ionski oblik neto naboja +2 prevladavat će kod $\text{pH} < 2$, dok će pri $\text{pH} = 2$ 50 % tetrapeptida imati neto naboj +2, a 50 % naboj +1.



Ionski oblik neto naboja +1 prevladavat će kod $2 < \text{pH} < 4$, dok će pri $\text{pH} = 4$ 50 % tetrapeptida imati neto naboj +1, a 50 % će biti u izoelektričnom obliku.



Izoelektrični oblik će prevladavati kod $4 < \text{pH} < 9,5$, dok će pri $\text{pH} = 9,5$ 50 % tetrapeptida imati neto naboj 0, a 50 % naboj -1.

- a) Ionski oblik neto naboja -1 dobit će se kada disocira α -aminoterminalna skupina ovog peptida. Iz titracijske krivulje možemo očitati da će se to postići kada se doda 1 mol OH^- iona po molu tetrapeptida počevši od točke u kojoj imamo izoelektrični oblik.

$$n(\text{NaOH}) = n(\text{tetrapeptida}) = 0,005 \text{ mol}$$

$$V(\text{NaOH}) = \frac{n(\text{NaOH})}{[\text{NaOH}]}$$

$$V(\text{NaOH}) = \frac{0,005 \text{ mol}}{0,001 \frac{\text{mol}}{\text{mL}}} = 5 \text{ mL}$$

U 100 mL 0,05M otopine izoelektričnog oblika peptida treba dodati 5 mL 1M otopine NaOH da bi peptid imao neto naboj -1.

- b) Iz titracijske krivulje je vidljivo da je, ako se kreće od potpuno protoniranog oblika peptida, u otopinu potrebno dodati 3 mol OH^- iona po molu tetrapeptida da bi dobili ionski oblik neto naboja -1.

$$n(\text{NaOH}) = 3 \times n(\text{tetrapeptida}) = 3 \times 0,005 \text{ mol} = 0,015 \text{ mol}$$

$$V(\text{NaOH}) = \frac{n(\text{NaOH})}{[\text{NaOH}]}$$

$$V(\text{NaOH}) = \frac{0,015 \text{ mol}}{0,001 \frac{\text{mol}}{\text{mL}}} = 15 \text{ mL}$$

U 100 mL 0,05M otopine potpuno protoniranog oblika peptida treba dodati 15 mL 1M otopine NaOH da bi peptid imao neto naboj -1.

5. primjer

Aminokiselinska analiza je pokazala da neki protein sadrži 4 Glu i 5 Asp, 4 Lys i 4 His ostatka. Koliko ostataka arginina mora sadržavati taj protein ako mu je pI oko 10,5? Objasnite.

Rješenje:

| Broj aminokiselinskih ostataka | Vrsta aminokiselinskog ostatka | Neto naboj pri pH 10,5 |
|--------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| 4 | Glu | -4 |
| 5 | Asp | -5 |
| 4 | Lys | +2 |
| 4 | His | 0 |
| | α -karboksilna skupina | -1 |
| | α -amino skupina | 0 |
| Ukupni naboj | | -8 |

Pri pH 10,5 pobočni ogranaci Glu i Asp će biti u disociranom obliku i dati ukupno 9 negativnih naboja. Od ukupno 4 lizinska ostatka 50 % tj. 2 će biti u disociranom obliku (bez naboja), a 2 u protoniranom (naboj 2 x (+1)) jer je pH = pK. Sva četiri histidinska ostatka bit će u disociranom obliku jer je pH za više od dvije jedinice veći od njihovog pK (6,8). Terminalna karboksilna skupina će biti disocirana (naboj -1), kao i terminalna amino skupina (naboj 0) jer je pH veći od njihovih pK vrijednosti. Ukupno će dakle biti 8 negativnih naboja u proteinu bez arginina. Budući da je pobočni ogranak Arg pri pH 10,5 pozitivno nabijen (pK = 12,5), da bismo dobili izoelektrični oblik molekule pri pH 10,5, ona mora sadržavati 8 ostataka Arg.

6. primjer

Proteinski lanac ima 15 kiselih i 30 baznih aminokiselina. Koliki će neto naboj imati ovaj protein pri pH 10,5 ako među baznim aminokiselinama ne sadrži lizin i ima 12 histidina.

Rješenje:

| Broj aminokiselinskih ostataka | Vrsta aminokiselinskog ostatka | Neto naboj pri pH 10,5 |
|--------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| 15 | kisele aminokiseline | -15 |
| 12 | His | 0 |
| 0 | Lys | 0 |
| 18 | Arg | +18 |
| | α -karboksilna skupina | -1 |
| | α -amino skupina | 0 |
| Ukupni naboj | | +2 |

Pri pH 10,5 pobočni ogranaci kiselih aminokiselinskih ostataka bit će disocirani i dati ukupno 15 negativnih naboja. Protein među baznim aminokiselinama ne sadrži lizin i ima 12 histidina, što znači da su preostalih 18 baznih aminokiselina arginini. Svih 12 histidinskih ostataka bit će u disociranom obliku jer je pH za više od dvije jedinice veći od njihovog pK (6,8), pa nemaju naboj. Svih 18 ostataka arginina će biti u protoniranom obliku jer je pH za 2 jedinice niži od

njihove pK vrijednosti. Terminalna karboksilna skupina će biti disocirana (naboj -1), kao i terminalna amino skupina (naboj 0) jer je pH veći od njihovih pK vrijednosti. Ukupni naboj proteina pri pH 10,5 bit će +2.

Zadatci za vježbu – disocijacija aminokiselinskih grupa i neto naboj molekula

1. Izračunajte koliki je udio (%) α -aminoterminalne grupe glicina u protoniranom obliku pri pH 7,5.
2. Izračunajte koliki je postotak protoniranog oblika karboksiterminalne grupe u nekom proteinu pri pH 3,2.
3. Izračunajte koliki će % ostataka lizina moći stvarati ionske veze s ostatkom asparaginske kiseline pri pH 9.
4. Izračunajte koliki je postotak disociranog oblika pobočnog ogranka cisteina ($pK=8,3$) u otopini pri pH 8.
5. U kojem rasponu pH će lizin prevladavati u ionskom obliku neto naboja +1?
6. U kojem rasponu pH će aspartat prevladavati u ionskom obliku neto naboja -1?
7. Napišite strukturnim formulama tetrapeptid Leu-His-Arg-Glu u izoelektričnom obliku i izračunajte pI ovog tetrapeptida.
8. Napišite strukturnim formulama peptid Glu-His-Pro u onom ionskom obliku koji bi prevladavao u otopini pri pH 3,8 i izračunajte pI ovog tripeptida.
9. Napišite strukturnim formulama peptid Lys-Glu-Ser-Trp u ionskom obliku neto naboja -1 te navedite u kojem pH području će prevladavati ovaj ionski oblik.
10. Proteinski lanac ima 15 kiselih i 30 baznih aminokiselina. Koliki će neto naboj imati ovaj protein kod pH 10,5 ako među baznim aminokiselinama ima 12 lizina i 6 histidina?
11. Aminokiselinska analiza je pokazala da neki protein sadrži 3 glutaminske, 6 asparaginskih kiseline, 10 lizina i 4 histidina. Koliko arginina mora sadržavati taj protein ako mu je pI oko: a) 10,5; b) 11,5? Objasnite odgovor.
12. Za neki protein je određena pI = 6,8. Aminokiselinska analiza je pokazala da protein sadrži 2 glutaminske, 8 asparaginskih kiseline, 1 lizin i 1 arginin. Koliko ostataka histidina mora sadržavati ovaj enzim s obzirom na svojstva?
13. Koliko ostataka lizina mora sadržavati protein ako mu je pI = 7,8 i sadrži ukupno 20 ostataka aspartata i glutamata, 10 ostataka histidina i ne sadrži arginin?
14. Koliko ostataka arginina mora sadržavati protein ako mu je pI 11,5 i sadrži ukupno 20 ostataka aspartata i glutamata, 30 ostataka lizina i ne sadrži histidin?

15. Što možete zaključiti o aminokiselinskom sastavu proteina koji ima pI točku u jako kiselom pH (< 3)?
16. Koji od sljedećih dipeptida će imati neto naboj +1 kod pH 5: a) Ala-Cys; b) His-Asp; c) Tyr-Glu; d) Leu-Arg; e) Val-Lys?
17. Prikažite strukturnim formulama i izračunajte neto naboj tripeptida Lys-Asp-Gly kod: a) pH 2.0; b) pH 6.0; c) pH 11.0.
18. Napišite strukturnim formulama peptid Arg-Glu-Asn-Pro u ionskom obliku neto naboja -1 te navedite u kojem pH području će prevladavati ovaj ionski oblik.
19. Napišite strukturnim formulama peptid Glu-His-Lys-Pro u izoelektričnom obliku, izračunajte njegovu pI vrijednost te navedite i objasnite u kojem pH području će prevladavati oblik neto naboja +2.
20. Napišite strukturnim formulama izoelektrični oblik peptida His-Ile-Asp-Lys te navedite i objasnite u kojem pH području će prevladavati oblik neto naboja +2.

Zadatci za vježbu – titracijske krivulje

1. Nacrtajte titracijsku krivulju histidina, izračunajte pI i označite je na krivulji.
2. Nacrtajte titracijsku krivulju arginina, izračunajte pI i označite je na krivulji.
3. Nacrtajte titracijsku krivulju peptida Pro-His-Arg i izračunajte pI ovog peptida.
4. Nacrtajte titracijsku krivulju tripeptida Pro-Arg-Glu i izračunajte koliko mL 0,1 M NaOH treba dodati u 500 mL 0,3 mM izoelektrične otopine ovog tripeptida da 50 % pobočnih ogranaka Arg bude u protoniranom obliku. ($M_{\text{rNaOH}} = 40$)
5. Nacrtajte titracijsku krivulju dipeptida His-Glu i izračunajte koliki volumen 0,1 M H_2SO_4 treba dodati u 100 mL 50 mM otopine ovog dipeptida kojoj je pH 9,5 da se pH spusti do izoelektrične točke. ($M_{\text{rH}_2\text{SO}_4} = 98,079$)
6. Nacrtajte titracijsku krivulju tripeptida Val-Glu-Lys i izračunajte koliki volumen 1 M $\text{Ca}(\text{OH})_2$ treba dodati u 250 mL 50 mM izoelektrične otopine ovog tripeptida da 50 % njegove aminoterminalne grupe bude u protoniranom obliku. ($M_{\text{rCa}(\text{OH})_2} = 74$)
7. Nacrtajte titracijsku krivulju tripeptida Asn-Arg-Asp i izračunajte koliko mililitara 1 M NaOH treba dodati u 500 mL 0,3M izoelektrične otopine ovog tripeptida da 50 % pobočnih ogranaka Arg bude u protoniranom obliku. ($M_{\text{rNaOH}} = 40$)
8. Koliko mL 25 %-tne HCl treba utrošiti da se 250 mL izoelektrične 1M otopine tripeptida His-His-His istitrira do pK vrijednosti terminalne α -karboksilne skupine ovog tripeptida ($M_{\text{rHCl}} = 36,5$)?
9. Koliko mL 25 %-tne HCl treba utrošiti da se 250 mL izoelektrične 1M otopine tripeptida His-Ala-Val istitrira do pK vrijednosti terminalne α -karboksilne skupine ovog tripeptida ($M_{\text{rHCl}} = 36,5$)?
10. Izračunajte koji bi ionski oblik tetrapeptida Pro-Asn-His-Lys prevladavao u otopini ako ste u 50 mL 20 mM otopine tog tetrapeptida kojoj je pH = 10,5 dodali 3,75 mL 0,2 M H_2SO_4 .

1.2. Pufferi

Pufer je smjesa slabe kiseline i njezine soli ili slabe baze i pripadne soli. Osnovno svojstvo pufera je da neutralizira dodatak određene količine H^+ ili OH^- iona u otopinu i na taj način održava početni pH konstantnim. Koliku količinu H^+ ili OH^- je moguće dodati u pufiranu otopinu, a da se pri tome pH bitno ne promijeni, ovisi o kapacitetu pufera. Iz toga proizlazi i svrha pufera: primjenjujemo ih kad neki medij želimo zaštititi od internih ili eksternih utjecaja, koji bi rezultirali promjenom pH-vrijednosti. Biološki važne molekule kao što su proteini ili nukleotidi sadrže funkcionalne skupine s karakteristikama slabih kiselina ili baza. Protonirane amino i karboksilne skupine aminokiselina ili fosfatne skupine u nukleotidima (npr. u ATP-u) djeluju kao slabe kiseline te je njihov stupanj ionizacije direktno ovisan o pH medija u kojem se nalaze. Za stabilizaciju proteina ili za vezanje supstrata na odgovarajući enzim važnu ulogu imaju ionske interakcije koje ovise o pH medija. Živi organizmi zahtijevaju konstantan pH u svim tjelesnim tekućinama što održava biomolekule u njihovom optimalnom ionskom stanju, a pri tome ključnu ulogu imaju pufferi. Najčešći endogeni pufferi u živim organizmima su fosfatni i karbonatni pufferi, a pufersko djelovanje imaju i molekule proteina uslijed disocijacije i protoniranja skupina aminokiselinskih ostataka od kojih su građeni.

Primjeri zadataka – pufferi

1. primjer

Izračunajte koliko treba uzeti glicina, a koliko NaOH za pripremu 500 mL pufera pH 10,0 koji je 25 mM s obzirom na glicin ($M_{rGly} = 75$; $M_{rNaOH} = 40$).

Rješenje:

Pri zadanom pH puferira α -amino skupina glicina pa treba izračunati koliki je omjer protoniranog i disociranog oblika ove skupine pri pH 10. Omjer protoniranog i disociranog oblika možemo izračunati pomoću Handerson-Hasselbalchove jednadžbe

$$pH = pK + \log \frac{[disocirano]}{[protonirano]}$$

U jednadžbu uvrstimo zadani pH i pK skupine koja puferira i izračunamo koliki je omjer disociranog i protoniranog oblika te skupine pri zadanom pH.

$$10 = 9,5 + \log \frac{[disocirano]}{[protonirano]}$$

$$0,5 = \log \frac{[disocirano]}{[protonirano]}$$

$$3,16 = \frac{[disocirano]}{[protonirano]}$$

$$[disocirano] = 3,16 \times [protonirano]$$

Ukupnu koncentraciju glicina u otopini dobijemo zbrajanjem koncentracija disociranog oblika puferirajuće skupine (ima ulogu soli) i protoniranog oblika puferirajuće skupine (ima ulogu kiseline u ovom puferu).

$$[disocirano] + [protonirano] = 25 \text{ mM}$$

Ukoliko koncentraciju disociranog oblika skupine izrazimo preko koncentracije protoniranog oblika možemo izračunati koncentraciju svakog od ova dva oblika skupine.

$$3,16 \times [protonirano] + [protonirano] = 25 \text{ mM}$$

$$4,16 \times [protonirano] = 25 \text{ mM}$$

$$[protonirano] = \frac{25 \text{ mM}}{4,16} = 6 \text{ mM}$$

Iz toga proizlazi da je koncentracija disociranog oblika skupine pri ovom pH jednaka:

$$[disocirano] = 3,16 \times 6 \text{ mM} = 18,96 \text{ mM}$$

Nakon što smo izračunali koncentracije disociranog i protoniranog oblika skupine možemo izračunati kolika je množina pojedinog oblika u zadanom volumenu od 0,5 L.

$$n(\text{protonirano}) = 6 \text{ mM} \times 0,5 \text{ L} = 3 \text{ mmol}$$

$$n(\text{disocirano}) = 18,96 \text{ mM} \times 0,5 \text{ L} = 9,48 \text{ mmol}$$

Množina dodanog NaOH treba biti jednaka množini disociranog oblika skupine jer dodatkom lužine u vodenu otopinu skupina disocira u ekvimolarnom odnosu, što znači da trebamo dodati toliko molova lužine koliko trebamo disociranog oblika puferirajuće skupine.

$$n(\text{NaOH}) = n(\text{disocirano}) = 9,48 \text{ mmol}$$

Iz toga možemo izračunati kolika je masa NaOH koju treba dodati u otopinu da bismo dobili željeni omjer disociranog i protoniranog oblika skupine:

$$m(\text{NaOH}) = n(\text{NaOH}) \times Mr_{\text{NaOH}}$$

$$m(\text{NaOH}) = 9,48 \times 10^{-3} \text{ mol} \times 40 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,379 \text{ g}$$

Množina potrebnog glicina jednaka je sumi množina protoniranog i disociranog oblika jer puferijski par čini protonirana α -amino i disocirana α -amino skupina glicina.

$$n(\text{Gly}) = 3 \text{ mmol} + 9,48 \text{ mmol} = 12,48 \text{ mmol}$$

$$m(\text{Gly}) = 12,48 \times 10^{-3} \text{ mol} \times 75 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,936 \text{ g}$$

Za pripremu ovog pufera potrebno je pomiješati 0,379 g NaOH i 0,936 g glicina i dodati vodu do 0,5 L.

2. primjer

Izračunajte koliko će se promijeniti pH ako se u 1 L pufera iz prvog primjera doda 0,02 mL H_2SO_4 . ($Mr_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 98,08$; $\rho_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 1,84 \text{ kg/L}$)

Rješenje:

U 1 L pufera ima 6 mmola protoniranog i 18,96 mmola disociranog oblika glicina (izračunato u prethodnom zadatku). Dodatkom kiseline smanjit će se udio disociranog oblika (puferirat će dodatak H^+ iona), a povećat će se udio protoniranog oblika za onoliko koliko je dodano H^+ iona.

Najprije treba izračunati koliki je broj molova H^+ u 0,02 mL H_2SO_4 . Stoga se prvo iz volumena i gustoće kiseline izračuna masa dodane kiseline, a zatim množina dodane kiseline.

$$m(\text{H}_2\text{SO}_4) = V \times \rho = 0,02 \text{ mL} \times 1,84 \frac{\text{g}}{\text{mL}} = 0,0368 \text{ g}$$

$$n(H_2SO_4) = \frac{m}{Mr} = \frac{0,0368 \text{ g}}{98,08 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 3,75 \times 10^{-4} \text{ mol} = 0,375 \text{ mmol}$$

Obzirom da disocijacijom H_2SO_4 iz svakog mola kiseline dobijemo 2 mola H^+ iona možemo izračunati koliku množinu H^+ iona smo dodali s ovim volumenom kiseline.

$$n(H^+) = 2 \times n(H_2SO_4) = 2 \times 0,375 \text{ mmol} = 0,750 \text{ mmol}$$

Koncentracije protoniranog i disociranog oblika glicina će se tada promijeniti na:

$$n(\text{protonirano}) = 6 \text{ mmol} + 0,750 \text{ mmol} = 6,75 \text{ mmol}$$

$$n(\text{disocirano}) = 18,96 \text{ mmol} - 0,750 \text{ mmol} = 18,21 \text{ mmol}$$

Novi pH će stoga biti:

$$pH = 9,5 + \log \frac{\left(18,21 \frac{\text{mmol}}{L}\right)}{\left(6,75 \frac{\text{mmol}}{L}\right)}$$

$$pH = 9,5 + 0,43$$

$$pH = 9,93$$

Razlika pH u odnosu na početni iznosi:

$$\Delta pH = 10 - 9,93 = 0,07$$

Promjena pH iznosi 0,07 jedinica.

Zadatci za vježbu – puferi

1. Koliko KH_2PO_4 ($M_r = 136$) i K_2HPO_4 ($M_r = 174$) treba odvagati za pripremu 500 mL 0,5 M pufera pH 8,0 ($pK_{\text{H}_2\text{PO}_4^-} = 7,22$)?
2. Koliko bi $\text{Ca}(\text{OH})_2$ trebalo dodati u 1L 0,5 M vodene otopine histidina da se dobije pufer kojemu je pH 6,5 ($M_r_{\text{Ca}(\text{OH})_2} = 74$)?
3. Koliki bi volumen 5 M otopine $\text{Ca}(\text{OH})_2$ trebalo dodati u 0,5L 0,5 M vodene otopine histidina da se dobije pufer kojemu je pH 6,5 ($M_r_{\text{Ca}(\text{OH})_2} = 74$)?
4. Koliko bi $\text{Ca}(\text{OH})_2$ trebalo dodati u 1L 0,25M vodene otopine histidina da se dobije pufer kojemu je pH 7 ($M_r_{\text{Ca}(\text{OH})_2} = 74$)?
5. Opišite pripremu (koliko koje komponente treba izvagati, odnosno pipetirati) 1L 0,1 M Na-acetatnog pufera čiji je pH = 3,8? ($M_r_{\text{NaAc}} = 82,03$; $M_r_{\text{HAc}} = 60,05$; $pK_a = 4,8$; $\rho_{\text{HAc}} = 1,05 \text{ g/cm}^3$).
6. Izračunajte koliki je maksimalni volumen 200 mM $\text{Ca}(\text{OH})_2$ moguće dodati u 500 mL 0,1M Na-acetatnog pufera čiji je pH = 3,8 ($pK_a=4,8$), a da pufer zadrži svoja svojstva?
7. Izračunajte koliki je maksimalni volumen 0,1 M otopine H_2SO_4 moguće dodati u 50 mL 50 mM glicinskog pufera pH 10, a da on zadrži puferska svojstva? ($M_r_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 98$).
8. Koliki bi volumen 5 M otopine KOH trebalo dodati u litru 0,1 M vodene otopine histidina da se dobije pufer kojemu je pH 6,2 ($M_r_{\text{His}} = 155$; $M_r_{\text{KOH}} = 56$)?
9. Koliko bi NaOH trebalo dodati u litru 0,5 M vodene otopine histidina da se dobije pufer kojemu je pH 6,5 ($M_r_{\text{NaOH}} = 40$; $M_r_{\text{His}} = 155$)?
10. Opišite pripremu (koliko koje komponente treba izvagati, odnosno pipetirati) 400 mL 50 mM glicin-HCl pufera pH 2,8 (HCl je 36 %-tna). ($M_r_{\text{Gly}} = 75$; $M_r_{\text{HCl}} = 36,46$; $\rho_{\text{HCl}} = 1,19 \text{ kg/L}$)

2. STRUKTURA I SVOJSTVA PROTEINA

2.1. Nekovalentne interakcije u biološkim sustavima

Interakcije molekula u biološkim sustavima su najčešće reverzibilne, što omogućuje uspostavljanje i prekidanje interakcija bez dodatnog ulaganja energije. Takve reverzibilne interakcije se uspostavljaju putem nekovalentnih veza. Nekovalentne veze koje se pojavljuju u biološkim sustavima su ionske veze, vodikove veze, van der Waalsove interakcije i hidrofobne interakcije. Ionske veze, vodikove veze i van der Waalsove interakcije su elektrostatske prirode. Hidrofobne interakcije nastaju kao posljedica hidrofилnog pritiska molekula vode na hidrofobne skupine kako bi se povećala ukupna entropija sustava (objašnjeno detaljnije niže u tekstu).

Najjača elektrostatska veza je ionska veza. Sila ionske veze definirana je Coulombovim zakonom:

$$F = \frac{k q_1 q_2}{r^2 D}$$

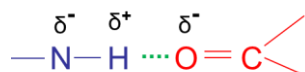
gdje su q_1 i q_2 naboji skupina, k je konstanta proporcionalnosti (Coulombova konstanta, $k = 1389$ kJ/mol), r udaljenost skupina, a D dielektrična konstanta otapala. Jakost veze je proporcionalna naboju, a obrnuto proporcionalna kvadratu udaljenosti grupa i dielektričnoj konstanti. Voda kao osnovno otapalo u biološkim sustavima slabi ionske interakcije jer ima visoku dielektričnu konstantu (Tablica 1.), odnosno i sama je polarna molekula pa je privlače nabijene grupe koje okružuje i na taj način ometa njihovo direktno povezivanje ionskom vezom. Ionske veze su jače u nepolarnom mediju gdje otapalo ne ometa njihovo privlačenje.

Tablica 1. Dielektrične konstante nekih otapala

| Otapalo | Dielektrična konstanta (pri 20 °C) |
|-----------|------------------------------------|
| benzen | 2,3 |
| kloroform | 5,1 |
| aceton | 21,4 |
| etanol | 24 |
| voda | 80 |

Vodikove veze su također elektrostatske interakcije koje nastaju između dvije polarizirane skupine, od kojih je jedna donor, a druga akceptor vodika u vodikovoj vezi. Vodik pri tome ostaje vezan za skupinu donora tj. ne dolazi do njegove disocijacije i prijelaza u

skupinu akceptora. Najčešće donorske skupine u biološkim sustavima su –OH i –NH skupine, u kojima dolazi do polarizacije zbog velike razlike u elektronegativnosti kisika i vodika, odnosno dušika i vodika. Elektronegativniji atomi kisika, odnosno dušika, privlače elektrone iz veze pa postaju parcijalno negativno nabijeni, a vodik postaje parcijalno pozitivno nabijen. Akceptor je najčešće opet kisik ili dušik koji je vezan na neki manje elektronegativan atom, pa zbog povlačenja veznih elektrona prema sebi postaje parcijalno negativno nabijen (Slika 2).



Slika 2. Vodikova veza između polariziranih skupina

Vodikova veza je slabija od ionske (4 do 20 kJ/mol naprema 5 – 200 kJ/mol ovisno o dielektričnoj konstanti otapala), a jakost joj ovisi o usmjerenju grupa koje se povezuju. Najjača veza se uspostavlja kad su grupe kolinearne (pod kutem od 180^0). Voda oslabljuje i ovu vrstu interakcija konkurirajući za uspostavljanje vodikovih veza s aminokiselinskim grupama.

Van der Waalove interakcije su posljedica momentalnih dipola koji nastaju u atomima uslijed kruženja elektrona oko jezgre, pri čemu se gustoća elektronskog oblaka oko jezgre atoma stalno mijenja. Van der Waalove sile uključuju sljedeće sile između dipola: dipol – dipol (Keesomove sile), dipol – inducirani dipol (Debyeve sile) i inducirani dipol - inducirani dipol (Londonove sile). Ovo su najslabije (2 – 4 kJ/mol) i najmanje specifične elektrostatske interakcije, ali je njihova suma u molekuli velika pa nisu zanemarive. Da bi se uspostavila ova vrsta interakcije atomi moraju biti točno na udaljenosti koja odgovara tzv. udaljenosti van der Waalsovog kontakta – ako su atomi udaljeniji, sila privlačenja naglo slabi, a ako se više približe sila privlačenja također slabi i prelazi u silu odbijanja.

Hidrofobne interakcije u stvari nisu prave interakcije, jer nema privlačnih sila ni veza između hidrofobnih molekula. Molekule vode se međusobno u otopini povezuju velikim brojem vodikovih veza stvarajući mrežu interakcija, ali se pri tome slobodno kreću po cijelom volumenu koji zauzimaju. Hidrofobne molekule su građene od atoma bliske elektronegativnosti, pa u njihovim molekulama ne dolazi do polarizacije naboja. Stoga ne mogu stupati u elektrostatske interakcije s polariziranim molekulama vode, ni s polarnim grupama općenito. Molekule vode potiskuju hidrofobne grupe da se skupe u što manjem volumenu unutar vodene otopine (tzv. hidrofilni pritisak) da bi sloj vode oko hidrofobnih molekula bio što manji. Naime, u okolini hidrofobnih molekula molekule vode nemaju takvu slobodnu pokretljivost kao u ostatku volumena vode, nego stvaraju uređeniji sloj oko njih. Ukupan broj

molekula vode u tom uređenijem sloju će biti manji ako su hidrofobne molekule na okupu nego ako su raspršene po cijelom volumenu otopine. Posljedica toga je manja ukupna uređenost sustava kad su hidrofobne grupe okupljene nego kad su razdvojene u vodenoj otopini, što je termodinamički povoljno jer na taj način raste entropija sustava (smanjuje se njegova uređenost).

U molekulama proteina u ionske interakcije može ulaziti relativno mali broj grupa, a to su pobočni ogranci kiselih (aspartat i glutamat) i bazičnih (lizin, arginin, histidin) aminokiselina te terminalna karboksilna i amino skupina. Zbog toga je broj ionskih interakcija u molekuli proteina relativno mali i ovisi o tome koliko ukupno kiselih i bazičnih aminokiselina protein ima u primarnoj strukturi i koliko su međusobno udaljene u tercijarnoj strukturi. Međutim, ovo su najjače nekovalentne interakcije, pa je suma veza ove vrste značajna. Vodikovu vezu može tvoriti znatno veći broj pobočnih ogranaka kao i atomi peptidne veze, pa je udio ove vrste veza u strukturi proteina obično veći nego ionskih. Međutim, vodikove veze su slabije od ionskih. Van der Waalsove interakcije su najslabije, ali ih se uspostavlja velik broj pa je i njihov doprinos održavanju strukture molekula proteina značajan.

2.2. Razine strukture proteina

Razlikujemo četiri nivoa strukture proteina – primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvaternu. Primarnu strukturu čini slijed aminokiselina u polipeptidnom lancu, a stabilizirana je peptidnim vezama koje ih povezuju. Sekundarna struktura nastaje formiranjem vodikovih veza u okosnici polipeptidnog lanca. Ovaj nivo strukture određuje raspored atoma okosnice polipeptidnog lanca u prostoru. Tercijarna struktura nastaje formiranjem veza između pobočnih ogranaka aminokiselinskih ostataka. Kvaternu strukturu nastaje povezivanjem više polipeptidnih lanaca u jednu molekulu.

Sekundarna struktura proteina nastaje formiranjem vodikovih veza između atoma peptidnih veza u okosnici polipeptidnog lanca. Unutar ove razine razlikujemo dvije periodične strukture – α -uzvojnica i β -nabranu ploču, te strukturni element β -okret. α -uzvojnica je štapićasta struktura čiju unutrašnjost čini tijesno uvijena polipeptidna okosnica, a pobočni ogranci pružaju se prema van u uzvojitom rasporedu (shematski prikaz ove strukture dan je u udžbeniku J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 40 - 44). Stabilizirana je vodikovim vezama između karbonilne skupine peptidne veze svake aminokiseline i NH-skupine peptidne veze aminokiseline koja je u linearnom slijedu četiri ostatka dalje. Vodikove veze u ovoj strukturi su paralelne međusobno i s osi pružanja

uzvojnice te povezuju grupe koje se nalaze jedna iznad druge u navoju. Za uspostavljanje strukture α -uzvojnice je nepovoljno da se jedan do drugoga u uzvojnici nalazi veći broj istoimeno nabijenih pobočnih ogranaka, jer se u tom slučaju oni odbijaju što dovodi do razvlačenja uzvojnice. Također, prolinski ostatak je jak prekidač ove strukture jer se zbog svog krutog planarnog prstena ne može savijati u čvrsto namotanu strukturu. Osim toga, njegova α -amino skupina koja je u peptidnoj vezi ne može sudjelovati u uspostavljanju vodikove veze koja stabilizira ovu strukturu zbog nedostatka slobodnog vodika na dušikovom atomu. Za razliku od α -uzvojnice, u strukturi β -nabrane ploče polipeptidni lanac je gotovo sasvim istegnut (shematski prikaz ove strukture dan je u udžbeniku J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 40 - 44). Pobočni ogranci su usmjereni ispod i iznad ravnine ploče, α -C atomi se nalaze u bridovima nabora ploče, a polipeptidna okosnica teče u smjeru pružanja ploče. β -nabrana ploča nastaje povezivanjem NH i CO skupina peptidnih veza unutar različitih dijelova polipeptidnog lanca vodikovim vezama. Veze su međusobno paralelne, ali okomite na smjer pružanja lanca pa ga ne sabijaju nego naprotiv, drže dijelove lanca na određenoj udaljenosti.

Tercijarna struktura predstavlja raspored svih atoma polipeptidnog lanca u prostoru, a stabilizirana je nekovalentnim vezama između grupa u pobočnim ograncima aminokiselinskih ostataka (ionskim, vodikovim, van der Waalsovima, hidrofobnim interakcijama), dok je od kovalentnih veza prisutna disulfidna veza.

Proteini koji sadrže više od jednog proteinskog lanca (tzv. oligomerni proteini) imaju kvaternu strukturu. Svaki polipeptidni lanac u ovakvom proteinu naziva se **podjedinicom**. **Podjedinice** su međusobno povezane nekovalentnim vezama između pobočnih ogranaka njihovih aminokiselinskih ostataka, a u nekim slučajevima i disulfidnim vezama. Oligomerni proteini mogu biti građeni od više jednakih (homopolimer) ili od različitih podjedinica (heteropolimer).

Primjeri zadataka – struktura proteina

1. primjer

Koji bi od sljedećih peptida mogao stvarati α -uzvojnica kod pH 7?

- (Lys-Gly-Ile-Pro-Asp-Gln-Gly)_n
- (His-Glu-Ser-Met-Asn-Leu-Met)_n
- (Lys-Lys-Arg-Ser-Lys-Ser-Arg)_n

Rješenje:

Peptid c) ne bi mogao stvarati α -uzvojnica kod pH 7 jer ima puno istoimeno nabijenih aminokiselinskih ostataka koji će se sterički odbijati i na taj način razvlačiti uzvojnica. Peptid a) ima ostatak prolina u strukturi koji zbog svog planarnog i krutog prstena otežava smatanje uzvojnice, a osim toga u peptidnoj vezi koju tvori svojom α -amino skupinom sa susjednom aminokiselinom nema vodikovog atoma koji je nužan za uspostavljanje vodikove veze koja stabilizira α -uzvojnica. Stoga niti peptid a) neće stvarati α -uzvojnica. Peptid b) bi mogao stvarati α -uzvojnica pri pH 7 jer nema prolina niti istoimeno nabijenih ostataka koji bi svojim odbijanjem razvlačili α -uzvojnica.

2. primjer

U nekom proteinu pobočni ogranak lizina stupa u interakciju s pobočnim ogranakom asparaginske kiseline. Objasnite kojom vrstom veze će se pobočni ogranci tih dviju aminokiseline povezivati i navedite u uspostavljanju kojih nivoa strukture proteina ova vrsta veze može sudjelovati.

Rješenje:

Pobočni ogranci ovih dviju aminokiselina mogu tvoriti ionske veze koje mogu sudjelovati u uspostavljanju tercijarne i kvarterne strukture proteina.

3. primjer

U nekom proteinu pobočni ogranak arginina stupa u interakciju s pobočnim ogranakom asparaginske kiseline. Ako u proteinu dođe do mutacije kojom se asparaginska kiselina zamijeni s: (a) lizinom; (b) glutaminskom kiselinom ili (c) treoninom, koja će od ovih promjena utjecati najviše, a koja najmanje na interakciju s argininom?

Rješenje:

Najmanje će utjecati zamjena asparaginske kiseline sa glutaminskom kiselinom jer pripadaju istoj skupini aminokiselina (kisele aminokiseline) i može stvarati ionske veze sa argininom kao i aspartat. Navije će utjecati zamjena asparaginske kiseline sa lizinom koji spada u bazične aminokiseline i čiji pobočni ogranak je pozitivno nabijen pa će se odbijati sa ostatkom arginina.

Zadatci za vježbu – struktura proteina

1. Koji bi od sljedećih peptida mogao stvarati α -uzvojnica kod pH 7?
 - d) (Asp-His-Ser-Val-Gln-Val-Met)_n
 - e) (Glu-Asp-Glu-Glu-Asp-Ser-Asp)_n
 - f) (Lys-Ala-Leu-Pro-Lys-Asp-Gly)_n
2. U nekom proteinu pobočni ogranak arginina stupa u interakciju s pobočnim ogranakom glutaminske kiseline. Napišite strukturnim formulama ove dvije aminokiseline, prikažite i objasnite kojom vrstom veze će se pobočni ogranci tih dviju aminokiseline povezivati. Navedite u uspostavljanju kojih nivoa strukture proteina ova vrsta veze može sudjelovati. Ako u proteinu dođe do mutacije kojom se glutaminska kiselina zamijeni s:
 - (a) lizinom,
 - (b) serinom,
 - (c) asparaginskom kiselinom,
 - (d) leucinom,koja će od ovih promjena utjecati najviše, a koja najmanje na interakciju s argininom?
3. Navedite, definirajte i poredajte po jakosti od najjače prema najslabijoj sve vrste veza koje stabiliziraju tercijarnu strukturu proteina.
4. Navedite najmanje tri aminokiseline koje mogu u tercijarnoj strukturi proteina:
 - a) stupiti u hidrofobne interakcije;
 - b) stvarati vodikove veze;
 - c) stvarati ionske veze.
5. Navedite barem četiri aminokiseline čiji pobočni ogranci pri pH 7 mogu stvarati vodikove ili ionske veze s pobočnim ogranakom arginina.

2.3. Svojstva proteina – topljivost

Topljivost proteina ovisi o dvije vrste interakcija: protein-protein i protein-otapalo. Što su jače interakcije među molekulama proteina, a slabije interakcije između proteina i otapala, protein će biti slabije topljiv. Svaki faktor koji utječe na interakcije protein-protein i/ili interakcije protein-otapalo utjecat će na topljivost proteina. Do taloženja proteina iz otopine će doći kada je koncentracija proteina veća od njegove topljivosti. Topljivost proteina u vodi ovisi o hidrofobnosti/hidrofilnosti samog proteina, pH otopine i ionskoj jakosti otopine. Protein koji sadrži više polarnih aminokiselinskih ostataka bit će topljiviji u vodi, jer s njom može uspostaviti više interakcija, nego protein koji sadrži više nepolarnih aminokiselinskih ostataka.

U slučaju kada je pH otopine jednak pI proteina, broj pozitivnih i negativnih naboja na molekuli proteina bit će jednak pa će protein biti najmanje polaran, uslijed čega će slabiti interakcije protein-otapalo. Ujedno će jačati interakcije protein-protein jer se molekule proteina neće međusobno odbijati i moći će stvoriti velik broj ionskih veza. Stoga će topljivost proteina biti najmanja kada je pH jednak njegovoj izoelektričnoj točki.

Na topljivost proteina utječe i ionska jakost otapala koja se povećava dodatkom soli u otopinu. Dodatak soli djelovat će tako da se do određenog stupnja zasićenja otopine solju topljivost proteina povećava, a daljnjim povećanjem zasićenja otopine solju topljivost proteina opada. Različiti proteini postižu maksimum topljivosti kod različitih koncentracija soli u otopini, ovisno o svojoj hidrofobnosti. Hidrofobniji proteini postižu maksimum topljivosti kod nižih koncentracija soli i talože se kod nižih koncentracija soli nego hidrofilniji proteini.

Primjeri zadataka – topljivost proteina

1. primjer

Za neki protein je poznato da ima najmanju topljivost pri pH 6,8. Ako protein u svom sastavu ima 7 Glu, 3 Asp, 6 Ser, 4 Lys, 5 Arg i 1 Phe, koliko His mora sadržavati?

Rješenje:

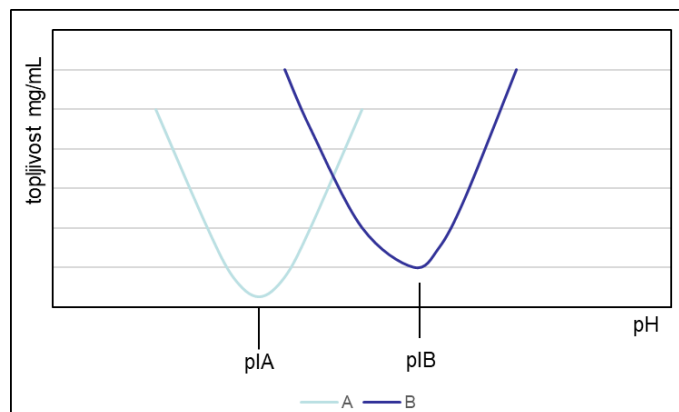
| Broj aminokiselinskih ostataka | Vrsta aminokiselinskog ostatka | Neto naboj pri pH 6,8 |
|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| 7 | Glu | -7 |
| 3 | Asp | -3 |
| 6 | Ser | 0 |
| 4 | Lys | +4 |
| 5 | Arg | +5 |
| 1 | Phe | 0 |
| | α -karboksilna skupina | -1 |
| | α -amino skupina | +1 |
| Ukupni naboj | | -1 |

Topljivost proteina je najmanja kada je pH jednak pI. Pri pH 6,8 50 % pobočnih ogranaka His je protonirano (naboj +1), a 50 % disocirano (bez naboja). Stoga su potrebna 2 His da bismo pri pH 6,8 dobili izoelektrični oblik ovog proteina.

2. primjer

Peptid A sadrži 56 % nepolarnih aminokiselina, a među polarnim prevladavaju neutralne i kisele aminokiseline, dok peptid B sadrži 25 % nepolarnih aminokiselina, a među polarnim prevladavaju bazične aminokiseline. Prikazite grafički (kvalitativno) i usporedite ovisnost topljivosti ovih peptida o pH otopine. Objasnite dijagram i razlike između peptida.

Rješenje:

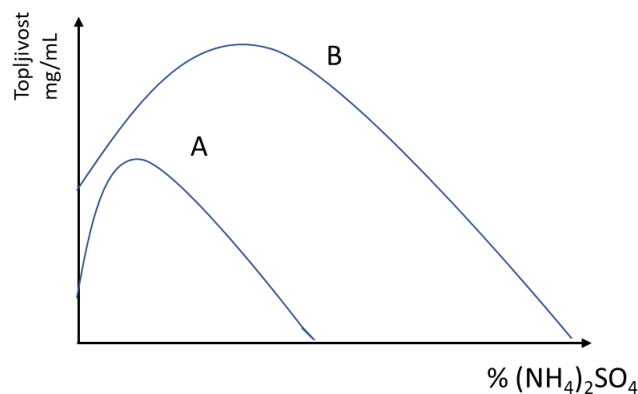


Protein A ima veći udio (56%) nepolarnih aminokiselina od proteina B (25% nepolarnih aminokiselina) pa je protein A hidrofobniji i manje topljiv u vodi. Među polarnim aminokiselinama proteina A prevladavaju kisele aminokiseline čije su pK vrijednosti niže od pK vrijednosti bazičnih aminokiselina. Zbog toga protein A postiže izoelektrični oblik pri nižim vrijednostima pH tj. ima niži pI nego protein B. Među polarnima aminokiselinama u primarnoj strukturi proteina B prevladavaju bazične aminokiseline sa višim vrijednostima pK pa se izoelektrični oblik postiže pri višim vrijednostima pH otopine (viši pI od proteina A). Proteini su najmanje topljivi kada je pH jednak pI jer su tada najjače protein – protein interakcije (jednak broj pozitivnog i negativnog naboja na molekuli omogućuje stvaranje većeg broja ionskih veza).

3. primjer

Nacrtajte kvalitativno krivulju ovisnosti topljivosti proteina A i proteina B o koncentraciji (postotku zasićenja otopine) amonijevog sulfata, ako znate da protein A ima veći udio hidrofobnih aminokiselina u primarnoj strukturi.

Rješenje:



Hidrofobniji proteini postižu maksimalnu topljivost kod nižih zasićenja otopine amonijevim sulfatom i talože se pri nižim zasićenjima nego hidrofilniji proteini.

4. primjer

Neki enzim u svom sastavu ima 12 kiselih aminokiselinskih ostataka, 4 Cys, 4 His, 6 Arg i 8 Lys. Objasnite da li će ovaj enzim biti topljiviji pri pH 8,3 ako je prethodno tretiran β -merkaptioetanolom ili ako nije prethodno tretiran β -merkaptioetanolom, uz pretpostavku da njegovi Cys ostatci međusobno mogu tvoriti disulfidne mostove.

Rješenje:

| broj i vrsta aminokiselinskih ostataka | naboj pri pH 8,3 uz dodatak β -merkaptioetanolu | naboj pri pH 8,3 bez dodatka β -merkaptioetanolu |
|--|---|--|
| 12 kiselih ostataka | -12 | -12 |
| 4 Cys | - 2 | 0 |
| 6 Arg | + 6 | + 6 |
| 8 Lys | + 8 | + 8 |
| 4 His | 0 | 0 |
| α -COOH | -1 | -1 |
| α -NH ₃ ⁺ | +1 | +1 |
| ukupno naboja: | 0 | + 2 |

Protein je topljiviji bez dodatka β -merkaptioetanolu jer su mu tada Cys ostatci povezani u disulfidne mostove pa je neto naboj enzima pri ovom pH +2, dok su uz dodatak β -merkaptioetanolu koji razara disulfidne mostove cisteinski ostatci slobodni i 50% ih je u disociranom obliku (pH = pK) pa se enzim nalazi u izoelektričnom obliku u kojem je najmanje topiv.

Zadatci za vježbu – topljivost proteina

1. Navedite i kratko objasnite koje su tvrdnje o topljivosti proteina netočne:
 1. topljivost se smanjuje slabljenjem protein-protein i jačanjem protein-otapalo interakcija;
 2. do taloženja proteina dolazi kada je koncentracija proteina u otopini veća od njegove topljivosti;
 3. protein-protein interakcije su najslabije kada je pH jednak pI proteina;
 4. topljivost proteina kod pH koji je za dvije pH jedinice veći od pI je veća nego kod pH koji je za dvije pH jedinice manji od pI;
 5. "hidrofilni" proteini će se taložiti pri većim koncentracijama soli nego "hidrofobni";
 6. većina proteina ima najveću topljivost u deioniziranoj vodi.
2. Peptid A ima sljedeću sekvencu Glu-His-Trp-Ser-Gly-Asp, a peptid B Ile-Phe-Pro-Gly-Val-Phe. Prikažite kvalitativno i usporedite ovisnost topljivosti ovih dvaju peptida o: a) pH; b) koncentraciji soli u otopini.
3. Nacrtajte kvalitativno krivulju ovisnosti topljivosti globulina i ovalbumina o koncentraciji (postotku zasićenja) amonijevog sulfata, ako znate da globulini imaju veći udio hidrofobnih aminokiselina u primarnoj strukturi.
4. Za neki enzim utvrđeno je da mu je topljivost najmanja pri pH 8,3 ako je prethodno tretiran β -merkaptetanom, a ako nije prethodno tretiran β -merkaptetanom najmanja topljivost zabilježena je kod pH 10,5. Enzim u svom sastavu ima 2 Asp i 10 Glu, te 2 Lys i 12 Arg. Koliko cisteina ima ovaj enzim u svom sastavu?
5. Za dva proteina poznati su sljedeći aminokiselinski sastavi:
 - protein A: 20 % Gly, 2 % Asp, 14 % Val, 17 % Leu, 1 % Glu, 7 % Phe, 3 % Arg, 4 % Lys, 2 % Ser, 5 % Thr, 25 % Ala;
 - protein B: 12 % Gly, 21 % Asp, 3 % Val, 1 % Leu, 17 % Glu, 1 % Phe, 14 % Arg, 11 % Lys, 10 % Ser, 10 % Thr.Nacrtajte (u istom koordinatnom sustavu) kvalitativno i usporedite krivulje ovisnosti topljivosti ova dva proteina o koncentraciji soli.

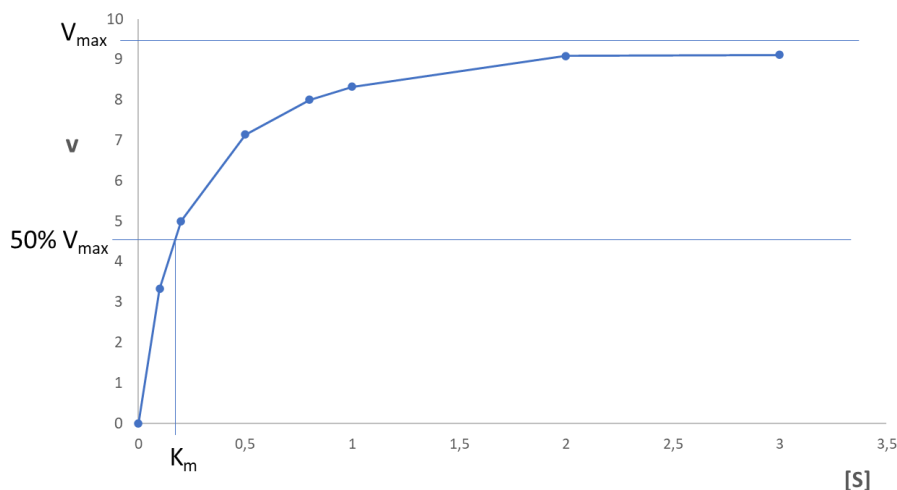
3. ENZIMSKA KINETIKA

3.1. Enzimski kinetika – brzina enzimskih reakcija

Brzina enzimске reakcije (v) se izražava količinom nastalog produkta u jedinici vremena. SI jedinica za brzinu reakcije je *katal* (mol/s). Međutim, ova jedinica je u laboratorijskim uvjetima prevelika pa se za izražavanje brzine enzimске reakcije obično koristi tzv. internacionalna jedinica IU ($\mu\text{mol}/\text{min}$). Faktori koji utječu na brzinu enzimskih reakcija su koncentracija enzima, koncentracija supstrata, pH, temperatura i eventualno prisutni inhibitori i aktivatori.

Brzina enzimске reakcije je proporcionalna koncentraciji enzima uz uvjet da je supstrat u suvišku. Veliki broj enzima slijedi Michaelis-Menten kinetiku koja opisuje ovisnost brzine enzimске reakcije o koncentraciji supstrata pri konstantnoj koncentraciji enzima i uz uvjet da se mjeri početna brzina reakcije. Za enzime koji slijede Michealis-Menten kinetiku ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata prikazana je hiperbolom (Slika 3.) i predložena je jednačinom:

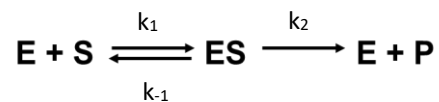
$$v = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$



Slika 3. Ovisnost brzine enzimске reakcije o koncentraciji supstrata

Maksimalna brzina (V_{max}) je brzina reakcije koja bi se postigla kad bi sav enzim (E) bio zasićen supstratom (S) tj. vezan u enzim-supstrat kompleks (ES) i kad bi sav ES kompleks

prešao u produkt. Jedinice za V_{\max} su jednake kao i za početnu brzinu reakcije (katal, IU), a vrijednost V_{\max} ovisi o koncentraciji enzima, temperaturi i pH pri kojem se odvija reakcija. Omjer konstanti brzina reakcija raspada (k_{-1} i k_2) i nastajanja (k_1) ES kompleksa naziva se Michaelisovom konstantom K_m :



$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

K_m ima jedinice koncentracije (mol/L), ne ovisi o koncentraciji enzima i supstrata, a ovisi o temperaturi i pH. Vrijednost K_m pokazuje koliki je afinitet enzima za vezanje supstrata. Ako je afinitet enzima za vezanje supstrata velik, onda je vrijednost K_m mala. U suprotnom, ako enzim ima mali afinitet za vezanje supstrata, onda je K_m vrijednost velika. Osim toga, K_m je jednak koncentraciji supstrata pri kojoj se postiže 50 % V_{\max} . Ako neki enzim nije strogo specifičan prema supstratu, nego može koristiti više vrsta supstrata, svaki par E i S imat će svoju vrijednost K_m .

Katalitička sposobnost enzima se izražava *brojem obrtaja*. Broj obrtaja je broj molekula supstrata koje jedno aktivno mjesto prevede u produkt u jedinici vremena u uvjetima kada je enzim potpuno zasićen supstratom. Jedinica kojom se izražava broj obrtaja je min^{-1} ili s^{-1} . Broj obrtaja se može poistovjetiti s konstantom k_2 i izračunati iz omjera V_{\max} i množine aktivnih mjesta (n):

$$\text{br. obrtaja} = \frac{V_{\max}}{n}$$

Efikasnost djelovanja enzima se izražava omjerom k_{cat}/K_m . Što je taj omjer veći, enzim je efikasniji katalizator (veća brzina katalize / manja vrijednost K_m). Specifična aktivnost (S_a) je omjer brzine enzimske reakcije i mase proteina u reakciji, a računa se prema formuli:

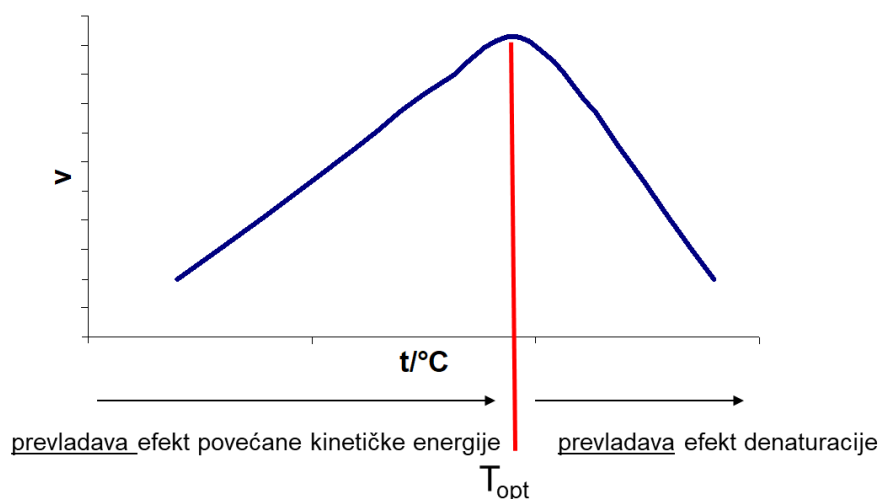
$$S_a = \frac{v}{m}$$

Jedinice za specifičnu aktivnost su IU/mg. Specifična aktivnost pokazuje čistoću enzimskog preparata, koja ovisi o tome je li u enzimskom preparatu prisutan samo enzim ili ima i drugih

vrsta proteina. Veća vrijednost specifične aktivnosti ukazuje na veću čistoću enzimskog preparata.

Da bi enzim bio aktivan njegovo aktivno mjesto mora imati točno određenu konformaciju, a grupe u aktivnom mjestu moraju imati odgovarajući ionski oblik koji omogućuje vezanje supstrata i/ili provođenje enzimske reakcije. Pri tzv. *optimalnom pH* grupe u aktivnom mjestu enzima su upravo u onom ionskom obliku koji odgovara vezanju supstrata i/ili provođenju reakcije. Stoga se enzimska reakcija odvija najvećom brzinom pri optimalnom pH. Ako se pH snizi ili povisi u odnosu na optimalni pH doći će do promjene naboja grupa u aktivnom mjestu i posljedično do smanjenja brzine reakcije. Brzina reakcije će se smanjiti proporcionalno udjelu enzima u reakcijskoj smjesi koji su izgubili odgovarajući ionski oblik grupa u aktivnom mjestu.

Povećanje temperature dovodi do povećanja kinetičke energije molekula enzima i supstrata koje se tada brže gibaju unutar volumena reakcijske smjese pa se uslijed toga češće sudaraju i nastaje više produkta u jedinici vremena. Povećanje temperature za 10 °C, u opsegu temperatura koje su niže od *optimalne temperature* (T_{opt}), rezultira u prosjeku (za većinu enzimskih reakcija) dva puta većom brzinom reakcije. Optimalna temperatura je temperatura pri kojoj se postiže najveća brzina enzimske reakcije. Kod temperatura viših od T_{opt} dolazi do naglog pada brzine reakcije jer efekt denaturacije enzima prevladava nad efektom povećanja kinetičke energije. Pri optimalnoj temperaturi ova dva efekta su u ravnoteži, što znači da je pri optimalnoj temperaturi udio denaturiranih molekula enzima već značajan (Slika 4.).



Slika 4. Ovisnost brzine enzimske reakcije o temperaturi

Posebnu kategoriju enzima predstavljaju tzv. alosterički enzimi. Alosterički enzimi su uvijek građeni od dvije ili više podjedinica i imaju najmanje dva aktivna mjesta te ne slijede Michaelis-Menten kinetiku. Prilikom vezanja određenih liganada na podjedinice alosteričkih

enzima dolazi do promjene njihove konformacije koja se prenosi na susjedne podjedinice (*efekt kooperativnosti*). Promjene konformacije mogu biti takve da dovedu do povećanja afiniteta susjednih podjedinica za vezanje supstrata (tzv. pozitivna kooperativnost) ili do smanjenja afiniteta susjednih podjedinica za vezanje supstrata (tzv. negativna kooperativnost). Razlikujemo *homotropnu* i *heterotropnu* alosteriju. Kod homotropne alosterije do promjene konformacije podjedinica dolazi uslijed vezanja supstrata u aktivno mjesto, a kod heterotropne alosterije promjenu konformacije podjedinica izaziva vezanje molekule efektora na regulatorno mjesto. Efektor može djelovati kao alosterički aktivator ili alosterički inhibitor. Pri homotropnoj alosteriji također može doći do pozitivne ili negativne kooperativnosti. Katalitičke podjedinice alosteričkog enzima se mogu nalaziti u T ili R konformaciji koje se međusobno razlikuju po afinitetu za vezanje supstrata. T konformacija ima manji afinitet za vezanje supstrata, a R konformacija ima veći afinitet za vezanje supstrata. Većina alosteričkih enzima pokazuje pozitivnu homotropnu kooperativnost, a omjer podjedinica u T i R konformaciji mijenja se s promjenom koncentracije supstrata. Kod malih koncentracija supstrata većina podjedinica se nalazi u T konformaciji, a s porastom koncentracije supstrata raste udio podjedinica u R konformaciji. Budući da se omjer podjedinica u T i R konformaciji mijenja s promjenom koncentracije supstrata, rezultirajuća krivulja u dijagramu ovisnosti brzine o koncentraciji supstrata ima sigmoidalan oblik. Kod pozitivne heterotropne kooperativnosti alosterički aktivator potiče prijelaz podjedinica u R konformaciju pri čemu dolazi do smanjenja K_m enzima za supstrat, dok alosterički inhibitori kod negativne heterotropne kooperativnosti potiču prijelaz podjedinica u T konformaciju pri čemu dolazi do povećanja K_m enzima za supstrat. Tip enzimske kinetike možemo razlikovati prema tome koliko puta treba porasti koncentracija supstrata da bi brzina reakcije porasla s 10 % V_{max} na 90 % V_{max} . Ako omjer potrebnih koncentracija supstrata iznosi 81 radi se o Michaelis-Menten kinetici. Ako je taj omjer znatno manji od 81 radi se o pozitivnoj kooperativnosti, a ako je znatno veći od 81 radi se o negativnoj kooperativnosti.

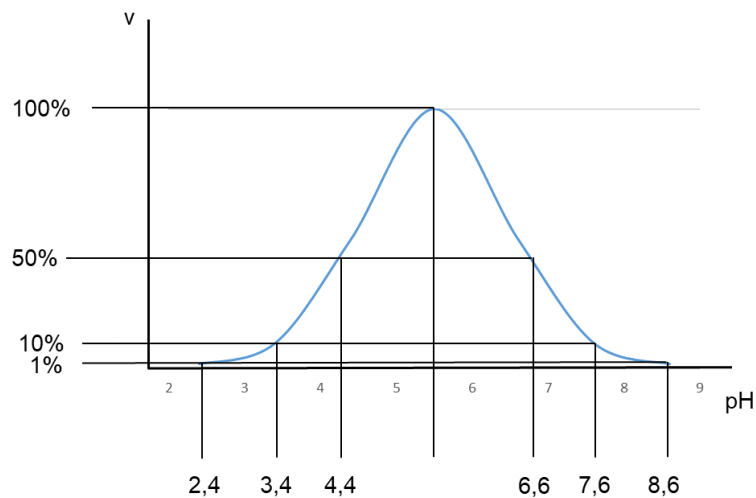
Primjeri zadataka – enzimska kinetika

1. primjer

Aktivno mjesto nekog enzima sadrži ostatke His₃₅ i Asp₅₂ koji su kritični za aktivnost. U slučaju ovog enzima pK vrijednost imidazolnog prstena histidina je 6,6, a karboksilne grupe asparaginske kiseline 4,4. Nacrtajte dijagram ovisnosti brzine reakcije o pH te naznačite

optimalni pH i vrijednosti pH pri kojima će enzim imati otprilike 1 %, 10 % i 50 % optimalne aktivnosti.

Rješenje:



Enzim će imati 50 % od optimalne aktivnosti kada je pH jednak pK vrijednosti grupa koje su ključne za aktivnost jer će tada samo 50 % molekula imati obje grupe u potrebnom ionskom obliku. Udio grupa u disociranom ili protoniranom obliku može se izračunati pomoću Handerson-Hasselbalchove jednadžbe. Tako je npr. pH pri kojem će 99% imidazolnog prstena histidina biti u disociranom obliku:

$$pH = 6,6 + \log \frac{0,99}{0,01} = 6,6 + 2 = 8,6$$

Brzinu reakcije ograničava ona grupa koje ima manje u odgovarajućem ionskom obliku, pa će stoga pri pH 3,4 kada samo 10 % molekula enzima ima ostatak Asp u disociranom obliku brzina biti 10 % od optimalne (iako pri tom pH sve molekule enzima imaju ostatak His u protoniranom obliku). Pri pH 7,6 je ostatak His ograničavajući jer samo 10 % molekula enzima pri tom pH ima ostatak His u protoniranom obliku. Optimalni pH će biti jednak aritmetičkoj sredini između ove dvije pK vrijednosti jer tada najveći mogući udio molekula enzima ima obje grupe u ispravnom ionskom obliku.

2. primjer

Izračunajte broj obrtaja i specifičnu aktivnost enzima ako znamo da 50 μ L enzimskog preparata prevede 100 μ mola supstrata u produkt za 10 minuta, što odgovara 50 % V_{max} . Koncentracija enzimskog preparata je 10 mg/mL; $M_{r_{enzima}} = 50\ 000$.

Rješenje:

Za izračunavanje broja obrtaja moramo znati kolika je V_{max} , a za specifičnu aktivnost kolika je brzina enzimske reakcije (v). Brzinu izračunamo kao omjer količine supstrata prevedenog u produkt i vremena trajanja reakcije.

$$v = \frac{100 \mu\text{mol}}{10 \text{ min}} = 10 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$$

Ova brzina je jednaka 50 % V_{\max} , iz čega proizlazi da je:

$$V_{\max} = 20 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$$

Masu enzima možemo izračunati iz koncentracije i volumena enzimskog preparata korištenog u reakciji:

$$m_{\text{enzima}} = \gamma \times V = 10 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 0,05 \text{ mL} = 0,5 \text{ mg}$$

Broj molova enzima izračunamo kao omjer mase enzima u reakciji i njegove molekulske mase:

$$n_{\text{enzima}} = \frac{m_{\text{enzima}}}{Mm} = \frac{0,5 \times 10^{-3} \text{ g}}{50000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 1 \times 10^{-8} \text{ mol} = 0,01 \mu\text{mol}$$

Iz dobivenih podataka konačno možemo izračunati broj obrtaja (b.o.) i specifičnu aktivnost preparata:

$$b. o. = \frac{V_{\max}}{n}$$

$$b. o. = \frac{20 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}}{0,01 \mu\text{mol}} = 2000 \text{ min}^{-1}$$

$$Sa = \frac{v}{m}$$

$$Sa = \frac{10 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}}{0,5 \text{ mg}} = 20 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min mg}}$$

3. primjer

Aktivnost nekog enzima je kritično ovisna o ionskom obliku histidinskog ostatka u njegovom aktivnom mjestu, koji za optimalnu aktivnost treba biti protoniran. Taj enzim pri pH 7,8 i 30 °C ima aktivnost od 2000 IU. Kolika će biti aktivnost ovoga enzima pri pH 6,8 i 20 °C?

Rješenje:

Pri pH 7,8 svega 10 % histidinskih ostataka je u protoniranom obliku, a aktivnost iznosi 2000 IU. 100 % aktivnosti bi enzim imao kada bi u svim molekulama enzima histidinski ostatci bili u protoniranom obliku. Aktivnost bi tada iznosila 20000 IU.

Pri pH 6,8 50 % histidinskih ostataka je u protoniranom obliku što znači da 50 % molekula enzima ima His u odgovarajućem ionskom obliku pa bi pri tom pH aktivnost bila jednaka 10000 IU.

Smanjenje temperature s 30 °C na 20 °C će rezultirati time da se aktivnost smanji dva puta, pa je aktivnost ovog enzima pri pH 6,8 i 20 °C jednaka 5000 IU.

4. primjer

Ako neki enzim pri koncentraciji supstrata koja je 40 puta veća od K_m vrijednosti za taj supstrat ima aktivnost od 1500 IU, koliko treba dodati supstrata da se postigne brzina reakcije od 250 $\mu\text{mola}/\text{min}$?

Rješenje:

Ovisnost brzine o koncentraciji supstrata predočena je Michaelis-Menten jednadžbom:

$$v = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Ako u jednadžbu uvrstimo sve poznate vrijednosti možemo iz nje izračunati kolika je V_{\max} uz zadanu koncentraciju supstrata:

$$1500 = V_{\max} \frac{40K_m}{K_m + 40K_m}$$

$$1500 = V_{\max} \frac{40K_m}{41K_m}$$

$$V_{\max} = 1500 \frac{41}{40} = 1537,5$$

Sada možemo izračunati potrebnu količinu supstrata za postizanje željene brzine od 250 $\mu\text{mola}/\text{min}$:

$$250 = 1537,5 \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$250 (K_m + [S]) = 1537,5 [S]$$

$$250 K_m = 1537,5 [S] - 250 [S]$$

$$250 K_m = 1287,5 [S]$$

$$[S] = \frac{250K_m}{1287,5} = 0,194 K_m$$

Da bismo postigli brzinu reakcije od 250 $\mu\text{mola}/\text{min}$ koncentracija supstrata u reakcijskoj smjesi treba biti jednaka 0,194 K_m .

5. primjer

Koliko 10 mM *p*-nitrofenilfosfata treba otpipetirati u reakcijsku smjesu ukupnog volumena 3 mL, koja sadrži 2 nmola kisele fosfataze, da se postigne 95 % maksimalne brzine reakcije, ako se 50 % maksimalne brzine postigne pri koncentraciji supstrata od 0,15 mmola/L?

Rješenje:

Iz Michaelis-Menten jednadžbe možemo izračunati potrebnu koncentraciju supstrata za postizanje 95 % V_{\max} . Koncentracija supstrata pri kojoj se postiže 50% V_{\max} je jednaka K_m vrijednosti iz čega proizlazi da je $K_m = 0,15$ mmol/L.

$$v = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$0,95 V_{\max} = V_{\max} \frac{[S]}{0,15 + [S]}$$

$$0,95 = \frac{[S]}{0,15 + [S]}$$

$$0,95 (0,15 + [S]) = [S]$$

$$0,1425 = [S] - 0,95 [S]$$

$$0,1425 = 0,05 [S]$$

$$[S] = 2,85 \text{ mM}$$

Iz izračunate koncentracije supstrata možemo izračunati koliko mmola supstrata je potrebno dodati u 3 mL reakcijske smjese. Iz podatka da bi količina supstrata u 1000 mL reakcijske smjese bi trebala biti 3,85 mmol možemo izračunati kolika je količina supstrata potrebna u 3 mL reakcijske smjese korištenjem razmjera.

$$2,85 \text{ mmol} : 1000 \text{ mL} = X \text{ mmol} : 3 \text{ mL}$$

$$x = \frac{2,85}{1000} \times 3 = 0,00855 \text{ mmol}$$

U 3 mL reakcijske smjese potrebno je dodati 0,00855 mmol supstrata da bi koncentracija supstrata u reakcijskoj smjesi bila 2,85 mM.

Kada znamo potreban broj mmola supstrata (0,00855) i koncentraciju otopine supstrata kojom raspolažemo (10 mM) možemo izračunati volumen otopine supstrata koji treba dodati u reakcijsku smjesu pomoću razmjera.

$$10 \text{ mmol} : 1000 \text{ mL} = 0,00855 \text{ mmol} : X \text{ mL}$$

$$X = 0,00855 \text{ mmol} \times \frac{1000 \text{ mL}}{10 \text{ mmol}}$$

$$X = 0,855 \text{ mL}$$

U 3 mL reakcijske smjese treba dodati 0,855 mL 10 mM otopine supstrata da bismo postigli željenu koncentraciju supstrata u reakcijskoj smjesi.

Zadatci za vježbu – enzimska kinetika

1. Enzim molekulske mase 75 kDa ima 3 identične podjedinice, a svaka sadrži po jedno aktivno mjesto. Koncentracija enzima u enzimskom preparatu iznosi 5 g/dm^3 . $20 \text{ }\mu\text{L}$ ovakvog preparata za 3 minute prevede $500 \text{ }\mu\text{mola}$ supstrata u produkt. Ako je ova brzina reakcije jednaka $90 \% V_{\text{max}}$ koliki je broj obrtaja enzima?
2. Mjerenjem brzine enzimске reakcije u reakcijskoj smjesi volumena 2 mL uz koncentraciju enzima $0,4 \text{ mg/mL}$ i $[S] = 40K_m$ određen je broj obrtaja $160\,000 \text{ min}^{-1}$. Kolika će biti brzina reakcije uz istu koncentraciju enzima ako je $[S] = K_m$? M_r enzima iznosi $80\,000$.
3. Za neki enzim poznato je da sadrži lizinski i histidinski ostatak u aktivnom mjestu koji su ključni za aktivnost. Za vezanje supstrata potrebno je stvaranje ionske veze s lizinom, a histidin ne smije biti nabijen. Izračunajte i objasnite u kojem području pH će ovaj enzim imati manje od 45% aktivnosti?
4. Izračunajte broj obrtaja i specifičnu aktivnost nekog enzima ako znamo da $300 \text{ }\mu\text{L}$ enzimskog preparata koji je 75% čist prevede 1 mmol supstrata u produkt za 10 minuta, što odgovara $60 \% V_{\text{max}}$. Koncentracija enzimskog preparata je $2,5 \text{ mg/mL}$, a M_r enzima je $50\,000$.
5. Izračunajte broj obrtaja i specifičnu aktivnost enzimskog preparata ako znamo da $25 \text{ }\mu\text{L}$ enzimskog preparata prevede $50 \text{ }\mu\text{mola}$ supstrata u produkt za 10 minuta, što odgovara $50 \% V_{\text{max}}$. Koncentracija enzimskog preparata je 5 mg/mL ; M_r enzima je $75\,000$.
6. Koncentracija proteina u enzimskom preparatu iznosi 1 g/L od čega je 50% sadržaj enzima. $200 \text{ }\mu\text{L}$ ovakvog preparata u zadanim uvjetima za 5 minuta prevede $50 \text{ }\mu\text{mola}$ supstrata u produkt. Ako je ova brzina reakcije jednaka $80\% V_{\text{max}}$, a M_r enzima je $250\,000$, koliki su broj obrtaja i specifična aktivnost enzima?
7. V_{max} nekog enzima u reakciji sa supstratom A iznosi $40 \text{ }\mu\text{mola/min}$, a kod $0,02 \text{ M}$ koncentracije supstrata izmjerena je brzina reakcije od $20 \text{ }\mu\text{mola/min}$. U reakciji sa supstratom B V_{max} iznosi $120 \text{ }\mu\text{mola/min}$, a brzina reakcije od $0,06 \text{ mmola/min}$ izmjerena je kod 30 mM koncentracije supstrata. Prema kojem suspstratu enzim pokazuje veći afinitet?
8. Broj obrtaja nekog enzima iznosi $3 \times 10^7 \text{ mola/molu min}$. Ako je koncentracija tog enzima 15 pM , kolika mu je aktivnost u katalima/mL preparata?
9. U tablici su navedene koncentracije supstrata i pripadne brzine enzimске reakcije. Koncentracija enzima prisutnog u reakciji je 10^{-6} M . Odredite V_{max} i K_m te izračunajte broj obrtaja enzima.

| | | | | | | |
|--|------|-----|------|-----|------|------|
| S (mM) | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 0,8 | 1,0 | 2,0 |
| V (mmol mL ⁻¹ min ⁻¹) | 3,33 | 5,0 | 7,14 | 8,0 | 8,33 | 9,09 |

10. Izračunajte koliko supstrata treba dodati nekom enzimu čija je koncentracija 5 mM, a K_m 300 μ M da se postigne 70 % V_{max} reakcije.
11. Poznato je da neki enzim za optimalnu aktivnost treba u svom aktivnom centru pobočni lanac histidina u protoniranom obliku. Izmjereno je da taj enzim pri pH 5 uz koncentraciju supstrata koja je 30 puta veća od K_m ima aktivnost od 900 IU. Kolika će biti aktivnost ovog enzima pri pH 7,8 uz koncentraciju supstrata jednaku K_m ?
12. Enzim A postiže 10 % V_{max} kod koncentracije supstrata od 0,1 mM i 90 % V_{max} kod 150 mM. Enzim B postiže 10 % V_{max} kod koncentracije supstrata 0,05 mM, a 90 % V_{max} kod 0,6 mM. Enzim C postiže 10 % V_{max} kod koncentracije supstrata 100 μ M, a 90 % V_{max} kod 8,1 mM. Navedite za svaki enzim slijedi li Michaelis-Menten kinetiku ili pokazuje efekt (pozitivne ili negativne) kooperativnosti.
13. Navedite koja je od sljedećih tvrdnji o Michaelis-Menten kinetici točna, a koja netočna te kratko objasnite netočne tvrdnje:
1. Kod male [S] brzina reakcije ne ovisi o [E];
 2. V_{max} je (matematički) jednaka umnošku ukupne [E] i broja obrtaja;
 3. Kada bi brzina reakcije bila jednaka V_{max} , koncentracija slobodnog enzima bila bi 0;
 4. K_m i V_{max} se mijenjaju s promjenom koncentracije enzima u reakcijskoj smjesi;
 5. Ako se 50 % enzima u reakcijskoj smjesi denaturira K_m se prividno smanji za 50 %;
 6. K_m pokazuje stabilnost kompleksa ES.
14. Ako neki enzim pri koncentraciji supstrata koja je 50 puta veća od K_m vrijednosti za taj supstrat ima aktivnost od 2000 IU, koliki volumen 10 mM otopine supstrata treba dodati u reakcijsku smjesu volumena 2 mL da se postigne brzina reakcije od 400 μ mola/min? K_m je 2 mM.
15. Izračunajte pri kojoj koncentraciji enzima u reakcijskoj smjesi bi brzina reakcije na 20 °C bila jednaka brzini reakcije izmjerenoj pri 40 °C uz [E] = 10 μ M?

3.2. Enzimska kinetika – tipovi inhibicije

Inhibitore dijelimo na reverzibilne i ireverzibilne inhibitore. Ireverzibilni inhibitori se ne mogu odvojiti iz kompleksa enzima i inhibitora (EI kompleksa), a svojim vezanjem u potpunosti onemogućuju provođenje reakcije pa je enzim na koji je vezan ireverzibilni inhibitor trajno inaktiviran. Michaelis-Menten konstanta uz dodatak inhibitora (K_m') će kod ovog tipa inhibicije biti jednaka K_m konstanti u reakciji bez dodatka inhibitora. Maksimalna brzina enzimske reakcije uz dodatak inhibitora (V_{max}') će biti manja od V_{max} reakcije u odsustvu inhibitora.

Reverzibilni inhibitori se za enzim vežu nekovalentnim vezama i mogu se otpustiti iz EI kompleksa, nakon čega je enzim ponovo potpuno aktivan. Razlikujemo više tipova reverzibilnih inhibitora – kompetitivne (konkurentne), nekompetitivne (nekonkurentne), parcijalno kompetitivne, parcijalno nekompetitivne i tzv. miješane tipove inhibitora. Različiti tipovi inhibitora na aktivnost enzima djeluju različitim mehanizmima, a može ih se razlikovati prema efektima koje imaju na kinetičke konstante enzima K_m i V_{max} , odnosno k_2 .

Kompetitivni inhibitori su strukturno slični supstratu što im omogućuje vezanje u aktivno mjesto enzima. Pri tome nastaje EI kompleks, čime je onemogućeno vezanje supstrata. Stoga enzim u čije je aktivno mjesto vezana molekula inhibitora ne može sintetizirati produkt. Budući da supstrat i kompetitivni inhibitor konkuriraju za isto mjesto na enzimu, povećanjem koncentracije supstrata moguće je smanjiti utjecaj inhibitora i "potisnuti" ga iz reakcije. Stoga je Michaelis-Menten konstanta uz dodatak inhibitora (K_m') veća od K_m neinhibirane reakcije, dok su V_{max} inhibirane i neinhibirane reakcije jednake. Za povećanje K_m u prisustvu konkurentnog inhibitora kažemo da je prividno, jer uslijed vezanja inhibitora ne dolazi do promjene afiniteta enzima prema supstratu. Michaelis-Menten jednadžba u slučaju kompetitivne inhibicije poprima sljedeći oblik:

$$v_i = V_{max} \frac{[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

v_i brzina inhibirane reakcije

V_{max} maksimalna brzina reakcije

$[S]$ koncentracija supstrata

K_m Michaelis-Menten konstanta

$[I]$ koncentracija inhibitora

K_i konstanta disocijacije EI kompleksa

Nekompetitivni inhibitor veže se na regulatorno mjesto na molekuli enzima zbog čega dolazi do promjene konformacije koja se odražava na katalitički dio aktivnog mjesta enzima. Posljedica je da enzim koji se nalazi u EI kompleksu postaje katalitički inaktivan (konstanta brzine reakcije nastajanja produkta iz EIS kompleksa $k_2' = 0$). Supstrat se, međutim, može normalno vezati u vezni dio aktivnog mjesta pa su vrijednosti K_m inhibirane i neinhibirane reakcije jednake. Brzina reakcije u prisustvu ovog tipa inhibitora smanjuje se proporcionalno udjelu enzima koji je u kompleksu sa inhibitorom. Stoga je i V_{max}' inhibirane reakcije manja od V_{max} neinhibirane reakcije. U ovom slučaju nije moguće potisnuti inhibitor iz reakcije povećanjem koncentracije supstrata. Michaelis-Menten jednadžba u tom slučaju poprima sljedeći oblik:

$$v_i = \frac{V_{max} [S]}{K_m (1 + \frac{[I]}{K_i}) + [S](1 + \frac{[I]}{K_i})}$$

v_i brzina inhibirane reakcije

V_{max} maksimalna brzina reakcije

$[S]$ koncentracija supstrata

K_m Michaelis-Menten konstanta

$[I]$ koncentracija inhibitora

K_i konstanta disocijacije EI kompleksa

Vežanje parcijalno kompetitivnog inhibitora na regulatorno mjesto enzima rezultira promjenom konformacije dijela aktivnog mjesta enzima koji je odgovoran za vežanje supstrata. Posljedica je otežano vežanje supstrata, uslijed čega je K_m' inhibirane reakcije veći od K_m neinhibirane reakcije. V_{max}' inhibirane reakcije jednaka je V_{max} neinhibirane reakcije.

Parcijalno nekompetitivni inhibitor vežanjem na regulatorno mjesto uzrokuje promjenu konformacije dijela aktivnog mjesta enzima koji je odgovoran za provođenje reakcije. Kod ovog tipa inhibicije ESI kompleks je katalitički aktivan, ali provođenje reakcije je usporeno ($k_2' < k_2$). K_m' inhibirane reakcije je jednak K_m neinhibirane reakcije. V_{max}' inhibirane reakcije je manja od V_{max} neinhibirane reakcije jer enzimi koji su u ESI kompleksu sporije provode reakciju od enzima koji su u ES kompleksu.

Miješani tip inhibitora vežanjem na regulatorno mjesto na molekuli enzima uzrokuje promjenu konformacije koja se odražava i na dio aktivnog mjesta koji je odgovoran za vežanje supstrata i na katalitički dio aktivnog mjesta. K_m' inhibirane reakcije je veći od K_m neinhibirane

reakcije, a brzina katalize je smanjena ($k_2' < k_2$). Stoga je i V_{\max} ' inhibirane reakcije manja od V_{\max} neinhibirane reakcije.

Primjeri zadataka – tipovi inhibicije

1. primjer

Neki enzim kod koncentracije supstrata od 40 mM ($K_m = 1$ mM) ima aktivnost 200 IU. Kolika će biti brzina reakcije ako se u 3 mL reakcijske smjese doda 0,02 mL 2 mM otopine kompetitivnog inhibitora ($K_i = 4$ mM)? Prilikom računanja zanemarite razrijeđenje uslijed dodatka inhibitora.

Rješenje:

Najprije moramo izračunati koncentraciju inhibitora u reakcijskoj smjesi.

$$n_{\text{inhibitora}} = [I] \times V_{\text{inhibitora}} = 0,02 \text{ mL} \times 2 \times 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol} = 0,04 \text{ mmol}$$

$$c_{\text{inhibitora}} = \frac{0,04 \text{ mmol}}{3 \text{ mL}} = 0,0133 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}} = 13,33 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$$

$$[S] = 40 \text{ mM}$$

$$K_m = 1 \text{ mM}$$

$$K_i = 4 \text{ mM}$$

$$V_{\max} = 200 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} = 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{min}}$$

$$v_i = V_{\max} \frac{[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

$$v_i = 0,2 \frac{40}{1 \left(1 + \frac{13,33}{4}\right) + 40} = 0,2 \frac{40}{44,3325} = 0,18 \text{ mmol/min} = 180 \text{ IU}$$

Brzina reakcije iznosit će 180 IU.

2. primjer

Koji od navedenih inhibitora će izazvati najveći pad aktivnosti enzima:

- kompetitivni inhibitor A za koji je $K_i = 12$ mM i dodan je u koncentraciji od 6 mM
- kompetitivni inhibitor B za koji je $K_i = 240$ μM i dodan je u koncentraciji od 0,48 mM
- nekompetitivni inhibitor C za koji je $K_i = 0,240$ mM i dodan je u koncentraciji od 480 μM.

Rješenje:

Jakost inhibitora ovisi o omjeru koncentracije inhibitora i K_i vrijednosti za taj inhibitor. Što je taj omjer veći pad brzine reakcije će biti veći.

$$\text{A } \frac{[I]}{K_i} = \frac{6 \text{ mM}}{12 \text{ mM}} = 0,5$$

$$\text{B } \frac{[I]}{K_i} = \frac{0,48 \text{ mM}}{0,24 \text{ mM}} = 2$$

$$\text{C } \frac{[I]}{K_i} = \frac{0,48 \text{ mM}}{0,24 \text{ mM}} = 2$$

Iz ovih omjera ja vidljivo da će konkurentni inhibitor B izazvati veći pad brzine reakcije nego konkurentni inhibitor A. Nekonkurentni inhibitor C će međutim izazvati najveći pad brzine reakcije jer utječe na katalitičku sposobnost enzima, pa se i K_m i $[S]$ u nazivniku Michaelis-Menten jednadžbe povećavaju za faktor $(1+[I]/K_i)$.

Zadatci za vježbu – tipovi inhibicije

1. Enzim ima aktivnost 200 IU pri koncentraciji supstrata od $20 K_m$ na $15\text{ }^\circ\text{C}$. K_m ovog enzima za supstrat iznosi $80\text{ }\mu\text{M}$. Kolika treba biti koncentracija kompetitivnog inhibitora za koji je K_i dva puta veći od K_m vrijednosti da brzina reakcije ostane ista na $35\text{ }^\circ\text{C}$?
2. Neki enzim ima dvije katalitičke podjedinice. Kolika će biti V_{\max} reakcija inhibiranih ireverzibilnim inhibitorom u odnosu na V_{\max} neinhibirane reakcije ako je u reakcijskoj smjesi:
 - a) koncentracija enzima i inhibitora jednaka;
 - b) koncentracija inhibitora dva puta manja od koncentracije enzima;
 - c) koncentracija inhibitora dva puta veća od koncentracije enzima?
3. Ako neki enzim, čiji K_m za supstrat iznosi 40 mM , ima aktivnost 100 IU pri koncentraciji supstrata od $10 K_m$ na $10\text{ }^\circ\text{C}$, koliko treba dodati kompetitivnog inhibitora čiji je K_i 2 puta manji od K_m vrijednosti za navedeni supstrat da brzina reakcije ostane ista na $30\text{ }^\circ\text{C}$?
4. Za neki je enzim kod 50 mM koncentracije supstrata ($K_m = 1\text{ mM}$) i temperature $17\text{ }^\circ\text{C}$ izmjerena brzina reakcije od $200\text{ }\mu\text{mol/min}$. Koliki volumen 1 M otopine kompetitivnog inhibitora ($K_i = 6\text{ mM}$) treba dodati u 3 mL reakcijske smjese da brzina reakcije ostane ista pri $37\text{ }^\circ\text{C}$? Prilikom računanja zanemarite razrjeđenje uslijed dodatka inhibitora.
5. Ako neki enzim uz $[S] = K_m$ ima aktivnost od 200 IU izmjereno na $30\text{ }^\circ\text{C}$, kolika će biti V_{\max} tog enzima u smjesi s ireverzibilnim inhibitorom čija je koncentracija 4 puta manja od koncentracije enzima, ako se brzina reakcije mjeri na $40\text{ }^\circ\text{C}$? Optimalna temperatura za aktivnost ovog enzima je $60\text{ }^\circ\text{C}$.
6. Neki enzim ima aktivnost od 100 IU na $25\text{ }^\circ\text{C}$. Aktivnost istog enzima mjerena kod $35\text{ }^\circ\text{C}$ uz dodatak nekompetitivnog inhibitora bila je 150 IU. Koliki je postotak inhibicije postignut dodatkom ovog inhibitora?
7. Koliko supstrata treba dodati u enzimsku reakciju da dodatak kompetitivnog inhibitora izazove smanjenje brzine enzimske reakcije za manje od 1 %, ako je $[I] = 10\text{ mM}$; $K_m = 0,15\text{ mM}$; $K_i = 5\text{ mM}$?
8. V_{\max} nekog enzima iznosi $200\text{ }\mu\text{mol/min}$. Kolika će biti V_{\max} u prisustvu kompetitivnog inhibitora dodanog u koncentraciji koja odgovara K_m vrijednosti enzima, ako se koncentracija enzima smanji za 15 % ?
9. U tablici su navedene koncentracije supstrata i brzine reakcije s/bez inhibitora. O kojem se tipu inhibicije radi? Veže li se inhibitor sa E, sa ES kompleksom ili s oboje? Objasnite odgovor.

| S (mM) | $v \left(\frac{\text{mmol}}{\text{mL min}} \right)$ | $v \text{ uz inhibitor} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{mL min}} \right)$ |
|--------|--|---|
| 0,2 | 5 | 3 |
| 0,4 | 7,5 | 5 |
| 0,8 | 10 | 7,5 |
| 1 | 10,7 | 8,3 |
| 2 | 12,5 | 10,7 |
| 4 | 13,6 | 12,5 |

10. Mjerenjem aktivnosti nekog enzima u prisustvu četiri različita inhibitora dobiveni su sljedeći podaci:

| | V_{\max} | K_m |
|-----------------|--------------------------------|-------------------|
| bez inhibitora | 102 $\mu\text{mol}/\text{min}$ | 0,1 mM |
| s inhibitorom A | 0,05 mmol/min | 100 μM |
| s inhibitorom B | 0,106 mmol/min | 1 mM |
| s inhibitorom C | 0,065 mmol/min | 500 μM |

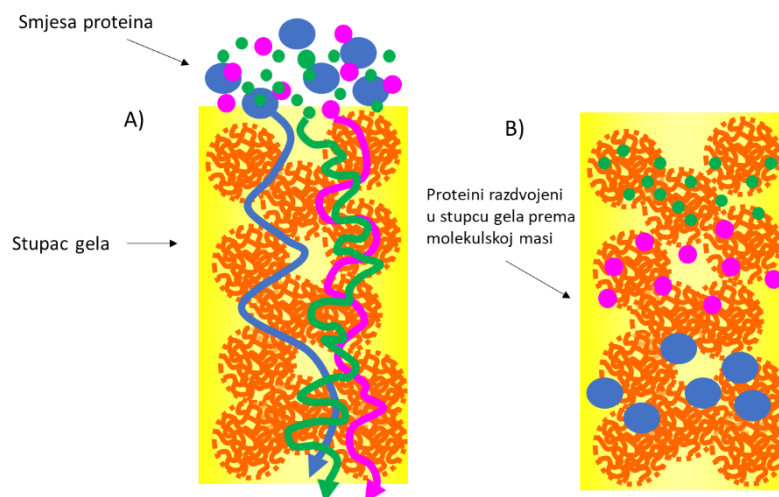
Poznato je da se u jednom slučaju radi o parcijalno kompetitivnom inhibitoru. Odgovorite i kratko objasnite koji podatci (A, B ili C) odgovaraju ovom inhibitoru.

4. PROČIŠĆAVANJE PROTEINA

Izolacija i pročišćavanje proteina započinje dezintegracijom stanične stijenke i/ili membrane čime se oslobađa kompletan unutarstanični sadržaj u kojem se uz protein koji želimo izolirati i pročistiti nalaze i svi ostali stanični proteini. Stoga se za prvi korak pročišćavanja obično koriste tzv. grupno-specifične metode koje razdvajaju grupe proteina na osnovu nekih njihovih zajedničkih karakteristika. Najčešće su to taložne metode koje razdvajaju proteine na osnovu razlike u njihovoj hidrofobnosti. Nakon toga se za daljnje pročišćavanje obično upotrebljavaju različite kromatografske metode, među kojima se najčešće koriste: gel-filtracija (razdvaja molekule prema razlici u veličini, odnosno molekulskoj masi), ionska izmjena (razdvaja molekule prema njihovom naboju pri određenom pH) i biospecifična (afinitetna) kromatografija (izdvaja proteine iz smjese na osnovu njihove specifične interakcije s određenim ligandom). Za praćenje uspješnosti izolacije i pročišćavanja proteina često se koriste elektroforetske metode koje se baziraju na razlici u putovanju nabijenih molekula proteina u električnom polju. Razlikujemo nativnu elektroforezu kojom se proteini razdvajaju na osnovu razlike u gustoći naboja (omjer naboja i molekulske mase proteina) i elektroforezu u denaturirajućim uvjetima (tzv. SDS-elektroforeza) kojom se proteini razdvajaju na osnovu razlike u molekulskoj masi. U elektroforetske metode pripada i izoelektrično fokusiranje kojim se proteini razdvajaju na osnovu razlike u izoelektričnim točkama.

Taložnim metodama se postiže frakcioniranje smjese proteina na skupine proteina slične hidrofobnosti. Kao sredstvo za taloženje mogu se koristiti anorganske soli, organska otapala ili polietilenglikol (PEG). Za frakciono taloženje proteina anorganskim solima najčešće se koristi amonijev sulfat. Hidrofobniji proteini se talože pri nižim, a hidrofilniji proteini pri višim koncentracijama soli.

Gel-filtracija je vrsta tekućinske kromatografije koja razdvaja molekule na principu razlike u njihovoj veličini, odnosno molekulskoj masi. Stacionarna faza se sastoji od dugačkih polimernih lanaca umreženih u sitne kuglice koje nisu kompaktne već sadrže pore različitih promjera, pri čemu promjer pora ovisi o stupnju umreženosti materijala (veći stupanj umreženosti – sitnije pore). Ove kuglice sačinjavaju krutu stacionarnu fazu i pakirane su u stupac u kromatografskoj koloni. Prostor između kuglica unutar stupca gela je ispunjen mobilnom fazom i čini tzv. "*prazni volumen kolone*" (volumen unutar stupca gela u kojem nema kuglica gela). Prilikom prolaska kroz kolonu molekule proteina iz uzorka kretat će se istom brzinom (koja je jednaka brzini protoka mobilne faze), ali će prolaziti različite duljine puta (Slika 5).



Slika 5. Princip razdvajanja proteina metodom gel filtracije. A) početak gel filtracije; B) razdvajanje proteina tijekom gel filtracije.

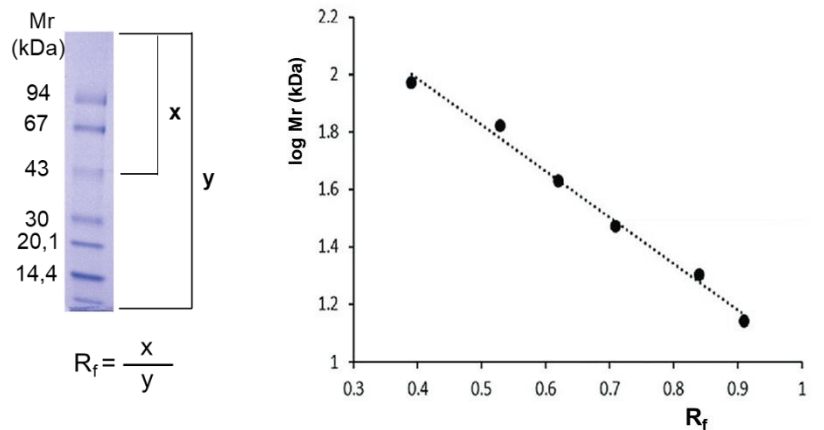
Molekule čiji je promjer veći od promjera pora u gelu neće moći ulaziti u pore nego će izaći iz kolone s volumenom mobilne faze koji odgovara praznom volumenu kolone. Molekule čiji je promjer manji od promjera pora gela ulazit će u pore i prolaziti dulji put kroz kolonu. Budući da sve pore nisu jednakog promjera, molekule određene veličine će u neke pore moći ulaziti, a u neke ne. Što je kolona dulja razdvajanje molekula različite veličine bit će uspješnije.

Kod kromatografije na ionskom izmjenjivaču stacionarna faza se sastoji od kuglica umreženog polimernog materijala na koji su vezane nabijene skupine. Vezane skupine mogu biti nabijene pozitivno ili negativno, a ovisno o svom naboju vezat će suprotno nabijene molekule iz uzorka. Nenabijene molekule i molekule čiji je naboj jednak onome na izmjenjivaču kroz kolonu prolaze bez vezanja. Vezani proteini se mogu otpustiti s kolone promjenom pH ili povećanjem ionske jakosti mobilne faze. Pri tome promjena pH mobilne faze treba biti takva da molekule proteina vezane na kolonu postanu neutralne ili poprime naboj jednak naboju funkcionalnih skupina na stacionarnoj fazi i otpuste se s izmjenjivača. Ako se radi o anionskom izmjenjivaču, pH mobilne faze se mora spustiti ispod pI vrijednosti vezanih molekula da bi one prešle u kationski (pozitivno nabijeni) oblik i otpustile se s izmjenjivača. Ako se radi o kationskom izmjenjivaču potrebno je povišiti pH iznad njihove pI točke da bi prešle u anionski (negativno nabijeni) oblik i otpustile se s izmjenjivača. Drugi način na koji se može postići elucija vezanih proteina je povećanje ionske jakosti mobilne faze dodatkom soli, najčešće NaCl u koncentraciji do 1 M. Koncentracija NaCl u mobilnoj fazi (tj. ionska jakost mobilne faze) potrebna za eluciju određene vrste vezanih proteina ovisi o tome koliko su čvrsto proteini vezani za stacionarnu fazu. Molekule proteina koje imaju više neto naboja će se čvršće vezati za izmjenjivač pa će biti potrebna veća koncentracija soli u mobilnoj fazi da bi ih

konkurencijom potisnula iz kolone, dok će se slabije nabijeni proteini manje čvrsto vezati na izmjenjivač pa će biti dovoljna niža koncentracija soli u mobilnoj fazi da se otpuste s kolone.

Biospecifična kromatografija se zasniva na specifičnom vezanju pojedine vrste proteina na odgovarajući ligand koji je vezan na stacionarnu fazu. Pri tome neki ligandi mogu ostvariti specifične interakcije s određenom grupom proteina koji dijele istu sposobnost interakcije s tim ligandom, a drugi ostvaruju specifičnu interakciju samo s jednom vrstom proteina. Vezani proteini se mogu s kolone otpustiti na više načina. Jedan način je da se kao mobilna faza upotrijebi denaturirajući pufer koji će izazvati denaturaciju vezanog proteina, a time i njegovo otpuštanje s liganda. Druga opcija za eluciju je da se u mobilnu fazu doda konkurentni ligand u višoj koncentraciji pa će se vezana molekula otpustiti s kolone i vezati za ligand u mobilnoj fazi te izaći iz kolone. Treći način je da se za eluciju koristi konkurentna molekula za koju protein ima veći afinitet nego za ligand, pa će se otpustiti s kolone i u kompleksu s konkurentnom molekulom izaći iz kolone. Četvrta mogućnost je da se za eluciju koristi konkurentna molekula čiji je afinitet za vezanje na ligand veći nego što je afinitet proteina za vezanje na ligand, pa će konkurencijom potisnuti protein iz kolone i ostati vezana na kolonu umjesto njega.

Nativna elektroforeza razdvaja proteine u električnom polju na osnovu razlike u njihovoj gustoći naboja pri određenom pH. Što je veći naboj molekule ona će se u električnom polju gibati brže. Međutim, molekule veće molekulske mase sporije se kreću u električnom polju jer im medij pruža veći otpor pri kretanju. Stoga će se brže kretati molekule velike gustoće naboja (puno naboja, mala molekulska masa), nego one čija je gustoća naboja mala (malo naboja, velika molekulska masa). SDS-elektroforezom razdvajaju se proteini koji su prethodno denaturirani djelovanjem SDS-a. Velike molekule proteina vežu proporcionalno više SDS-a od malih molekula proteina, pa stoga vezanjem SDS-a sve molekule proteina dobiju jednaku gustoću naboja. Kod SDS-elektroforeze dolazi do izražaja djelovanje gela kao "molekularnog sita" tj. što su molekule proteina veće molekulske mase to se teže provlače kroz pore gela i zato se sporije kreću na elektroforezi. Na taj način se proteini razdvajaju prema molekulskoj masi, a ne prema gustoći naboja. Elektroforetska pokretljivost proteina na SDS elektroforezi je obrnuto proporcionalna logaritmu njihove molekulske mase. Molekulska masa proteina može se odrediti pomoću baždarnog dijagrama (Slika 6) koji se dobije mjerenjem R_f vrijednosti (omjer duljine puta koji je prešla molekula i duljine gela) za proteine poznatih molekulskih masa (standarde).



Slika 6. Baždarni dijagram za određivanje Mr proteina SDS-elektroforezom

Nadalje, SDS-elektroforeza se može provoditi u reducirajućim uvjetima (uz dodatak β -merkaptoetanolu) ili u nereducirajućim uvjetima (bez dodatka β -merkaptoetanolu). Dodatak β -merkaptoetanolu razorit će disulfidne mostove koji mogu biti prisutni u terciarnoj ili kvaternoj strukturi proteina, a koje nije moguće razoriti dodatkom SDS-a. U slučaju kada se SDS-elektroforeza provodi u nereducirajućim uvjetima proteini koji imaju disulfidne mostove u svojoj strukturi neće biti potpuno denaturirani i imat će različitu elektroforetsku pokretljivost nego kada se SDS-elektroforeza provodi u reducirajućim uvjetima. Tako će npr. u slučaju kada su podjedinice proteina povezane disulfidnim mostovima one tijekom SDS-elektroforeze u nereducirajućim uvjetima ostati i dalje povezane, iako mi je terciarna struktura razorena, i putovat će zajedno kroz gel za elektroforezu.

Izoelektrično fokusiranje je elektroforetska metoda pomoću koje se proteini razdvajaju na osnovu razlike u izoelektričnim točkama. Pri ovoj vrsti elektroforeze u gel se dodaju tzv. amfoliti. Amfoliti su molekule koje i u izoelektričnom obliku djeluju puferski te na taj način stabiliziraju pH gradijent u gelu. Proteini se zaustavljaju (fokusiraju) u dijelu gela u kojem je pH jednak njihovoj pI, pa se razvoje na osnovu razlike u njihovim izoelektričnim točkama.

Uspješnost pročišćavanja enzima se može pratiti određivanjem specifične aktivnosti i stupnja pročišćavanja, čistoće preparata i prinosom. Specifična aktivnost (Sa) je omjer aktivnosti i mase proteina u enzimskom preparatu i izražava se u jedinicama IU/mg. Veća vrijednost specifične aktivnosti znači da je enzimski preparat čišći, tj. da je u njemu uz enzim prisutno manje drugih proteina. Čistoća preparata izražava se u postocima (%) kao maseni udio enzima u odnosu na masu ukupnih proteina u preparatu. Stupanj pročišćavanja (Sp) je omjer specifične aktivnosti nakon i prije provedenog koraka pročišćavanja. Stupanj pročišćavanja nema jedinice i pokazuje koliko je puta povećana Sa nakon nekog koraka pročišćavanja. Prinos

je količina enzima sačuvana tijekom pročišćavanja u odnosu na količinu enzima koja je bila prisutna u preparatu prije pročišćavanja i izražava se u postocima (%).

Primjer praćenja uspješnosti pročišćavanja proteina prikazan je u Tablici 2. u kojoj su unesene vrijednosti dobivene mjerenjem koncentracije proteina i količine enzimske aktivnosti na početku pročišćavanja (sirovi ekstrakt) i nakon svakog od tri provedene koraka pročišćavanja (frakciono taloženje proteina amonijevim sulfatom, gel-filtracija, ionska izmjena).

Tablica 2. Primjer praćenja uspješnosti postupka pročišćavanja proteina

| Uzorak | Masa proteina (mg) | Ukupna aktivnost (IU) | Sa (IU/mg) | Sp | čistoća preparata (%) | prinos (%) |
|----------------------|--------------------|-----------------------|------------|------|-----------------------|------------|
| sirovi ekstrakt | 120,75 | 381 788,56 | 3 161,81 | 1 | 2,56 | 100 |
| taloženje amonijevim | 21,54 | 320 190,81 | 14 864,94 | 4,7 | 12 | 83,9 |
| gel filtracija | 7,79 | 288 089,4 | 36 981,95 | 11,7 | 29,9 | 75,46 |
| ionska izmjena | 0,89 | 109 968,9 | 123 560,56 | 39,1 | 100 | 28,8 |

Primjeri zadataka – pročišćavanje proteina

1. primjer

Smjesa aminokiselina Glu, Gln, Lys, Arg i His nanosena je na kationski izmjenjivač pri pH 1,0. Kojim redom će se te aminokiseline eluirati sa stupca povećanjem koncentracije NaCl u mobilnoj fazi?

Rješenje:

Najprije treba izračunati kolike su izoelektrične točke pojedinih nanosenih molekula i kolika je razlika između njihove pI i pH pri kojoj su nanosene na kolonu. Što je razlika veća, molekule će imati više neto naboja i čvršće se vezati za kolonu pa će biti potrebna veća koncentracija NaCl u mobilnoj fazi da bi se otpustile s kolone.

$$\begin{aligned}
 pI_{Glu} &= \frac{2+4}{2} = 3 & pI - pH &= 2 \\
 pI_{Glu} &= \frac{2+9,5}{2} = 5,75 & pI - pH &= 4,75 \\
 pI_{Lys} &= \frac{9,5+10,5}{2} = 10 & pI - pH &= 9 \\
 pI_{Arg} &= \frac{9,5+12,5}{2} = 11 & pI - pH &= 10 \\
 pI_{His} &= \frac{6+9,5}{2} = 7,75 & pI - pH &= 6,75
 \end{aligned}$$

Eluirat će se prvo Glu, zatim Gln, His, Lys i posljednji Arg.

2. primjer

Smjesa proteina A ($M_r = 31000$), B ($M_r = 65000$) i C ($M_r = 92000$) nanosena je na kolonu za gel-filtraciju. Kojim redosljedom će se nanoseni proteini eluirati iz kolone za gel-filtraciju?

Rješenje:

Iz kolone za gel-filtraciju nanoseni prvo će se eluirati C pa B pa A jer protein C ima najveću M_r pa zatim redom proteini B, pa A. Što je protein manje M_r ima dulji put u koloni i dulje se u njoj zadržava.

3. primjer

Smjesa proteina A ($pI = 5,7$), B ($pI = 8,2$), C ($pI = 7,2$) i D ($pI = 6,4$) nanosena je na kolonu kationskog izmjenjivača kod pH 6,0. Vezani proteini su u jednom slučaju eluirani puferom pH 7,5, a u drugom slučaju puferom pH 8,5. Koji proteini i kojim redosljedom će se eluirati iz kolone u prvom, a koji u drugom slučaju?

Rješenje:

Proteini čiji je pI veći od pH 6 će biti u kationskom obliku i vezat će se za kolonu. Na kationski izmjenjivač će se vezati proteini: B, C i D. Protein A se neće vezati na kationski izmjenjivač nego će proći kroz kolonu bez vezanja (prije početka elucije). Da bi se vezani proteini eluirali pH pufera za eluciju mora biti veći od njihove pI (da bi prešli u anionski oblik). Nakon elucije pri pH 7,5 iz kolone za ionsku izmjenu izlaze proteini C i D, a B ostaje vezan na kolonu jer je i dalje u kationskom obliku. Nakon elucije pri pH 8,5 iz kolone za ionsku izmjenu izlaze proteini B, C i D.

4. primjer

Smjesa proteina A ($pI = 5,7$ i $M_r = 31000$), B ($pI = 8,2$ i $M_r = 32000$), C ($pI = 7,2$ i $M_r = 65000$) i D ($pI = 6,4$ i $M_r = 92000$) nanosena je na kolonu kationskog izmjenjivača kod pH 6,0. Vezani proteini su u jednom slučaju eluirani puferom pH 7,5, a u drugom slučaju puferom pH 8,5 te zatim nanoseni na kolonu za gel-filtraciju. Koji proteini i kojim redosljedom će se eluirati iz kolone za gel-filtraciju u prvom, a koji u drugom slučaju?

Rješenje:

Proteini čiji je pI veći od pH 6 će biti u kationskom obliku i vezat će se za kolonu. Na kationski izmjenjivač će se vezati proteini: B, C i D. Protein A se neće vezati na kationski izmjenjivač nego će izaći iz kolone prije početka elucije vezanih proteina pa stoga neće biti prenesen na kolonu za gel-filtraciju. Da bi se vezani proteini eluirali pH pufera za eluciju mora biti veći od

njihove pI (da bi prešli u anionski oblik). Nakon elucije pri pH 7,5 iz kolone za ionsku izmjenu izlaze proteini C i D, dok protein B ostaje vezan na kolonu jer je njegov pI veći od 7,5 i on je pri ovom pH i dalje u kationskom obliku. Nakon elucije pri pH 8,5 iz kolone za ionsku izmjenu izlaze svi vezani proteini (B, C i D) jer je 8,5 veće od pI vrijednosti za sve njih.

Kada su na gel-filtraciju nanoseni proteini eluirani pri pH 7,5 (dakle proteini C i D) iz kolone za gel-filtraciju će prvo izaći D pa C jer D ima veću M_r nego C. Nakon elucije pri pH 8,5 iz kolone za gel-filtraciju izlazi prvo D, pa C pa B jer se tim slijedom smanjuju njihove M_r .

5. primjer

Prilikom određivanja molekulske mase proteina A i B gel-filtracijom ustanovljeno je da molekulska masa proteina A iznosi 16000, a proteina B 21000. Prilikom određivanja molekulske mase proteina A i B SDS-elektroforezom uz dodatak β -merkaptetanola ustanovljeno je da molekulska masa proteina A iznosi 8000, a proteina B 7000. Prilikom određivanja molekulske mase proteina A i B SDS-elektroforezom bez dodatka β -merkaptetanola ustanovljeno je da molekulska masa proteina A iznosi 16000, a proteina B 7000. Što možete zaključiti o strukturi ovih proteina?

Rješenje:

Suma M_r podjedinica nekog proteina mora biti jednaka ukupnoj M_r tog proteina u nativnom obliku koja je izmjerena gel-filtracijom. Na osnovu toga može se zaključiti da protein A ima dvije podjedinice čiji je $M_r = 8000$, a protein B tri podjedinice čiji je $M_r = 7000$. Tretiranje proteina samo SDS-om dovodi do pucanja nekovalentnih interakcija, dok tretiranje proteina SDS-om uz dodatak β -merkaptetanola dovodi do pucanja svih nekovalentnih interakcija i disulfidnih mostova u kvaternoj i terciarnoj strukturi proteina. Iz rezultata se može zaključiti da protein A ima dvije jednake podjedinice molekulske mase 8000 povezane nekovalentnim interakcijama i disulfidnim mostovima, jer bez dodatka β -merkaptetanola ima jednaku M_r na SDS-elektroforezi kao i na gel-filtraciji pošto mu se podjedinice drže disulfidnim mostovima. Protein B ima tri podjedinice molekulske mase 7000 povezane samo nekovalentnim interakcijama jer je ustanovljena ista M_r uz dodatak β -merkaptetanola i bez njega, što znači da mu podjedinice nisu povezane disulfidnim mostovima.

6. primjer

Količina ukupnih proteina u sirovom enzimskom preparatu iznosi 250 mg. Specifična aktivnost sirovog preparata iznosi 10 IU/mg. Pročišćavanje je provedeno uz stupanj pročišćavanja 5 bez gubitaka enzimske aktivnosti. Kolika je čistoća (%) preparata nakon pročišćavanja ako znate da je specifična aktivnost čistog enzima 120 IU/mg? Koliki je bio udio (%) enzima u sirovom enzimskom preparatu?

Rješenje:

Budući da prilikom pročišćavanja nije bilo gubitaka aktivnosti, pet puta veća S_a nakon pročišćavanja ukazuje da se masa proteina u preparatu smanjila pet puta. Čistoća preparata se

može izračunati na osnovu Sa čistog enzima iz koje vidimo da 1 mg čistog enzima daje 120 IU aktivnosti. Stoga za 2500 IU aktivnosti u preparatu mora biti prisutno 20,8 mg enzima, što čini 41,6 % od ukupno 50 mg proteina, odnosno 8,32 % od početnih 250 mg proteina u sirovom preparatu.

$$\begin{aligned} m_1 &= 250 \text{ mg} \\ a_1 &= 2500 \text{ U} \\ S.p. &= 5 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} a_2 &= 2500 \text{ U} \\ m_2 &= 50 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{array}{l} \text{čistoća preparata (\%)} \\ \begin{array}{l} 1 \text{ mg} \longrightarrow 120 \text{ U} \\ x \longrightarrow 2500 \text{ U} \end{array} \\ \hline x = 20,8 \text{ mg} \end{array} \qquad \frac{20,8}{50} \times 100 = 41,6 \%$$

$$\begin{array}{l} \text{udio enzima (\%)} \\ \frac{20,8 \text{ mg}}{250 \text{ mg}} \times 100 = 8,32 \% \end{array}$$

Zadatci za vježbu – pročišćavanje proteina

1. Poznato vam je da se proteinska smjesa sastoji od 5 proteina sljedećih karakteristika: A ($M_r = 30\,000$, $pI = 4.8$); B ($M_r = 67\,000$, $pI = 7.2$); C ($M_r = 65\,000$, $pI = 4.75$), D ($M_r = 29\,000$, $pI = 8.3$), E ($M_r = 66\,000$, $pI = 6.0$). Kako biste potpuno razdvojili ove proteine preparativnim metodama?
2. Na kolonu punjenu kationskim izmjenjivačem nanesa je smjesa sljedećih tripeptida:
Pro-His-Leu, Arg-Lys-Glu i Asp-Ile-Val. Odgovorite:
 - a) Koji će se od navedenih tripeptida vezati na izmjenjivač kod $pH = 4,5$?
 - b) Hoće li do elucije vezanih tripeptida doći sniženjem ili povišenjem pH ?
 - c) Kojim će se redom vezani tripeptidi eluirati?
3. Smjesa proteina A, B i C nanesa je na kolonu anionskog izmjenjivača pri $pH 6,5$. Kolona je zatim isprana istim puferom pa eluirana puferom čiji je $pH 3,8$. Eluat je nakon toga nanesen na kolonu za gel-filtraciju. Protein A ima $pI = 4,8$ i $M_r = 25000$; protein B ima $pI = 7,6$ i $M_r = 53000$; protein C ima $pI = 5,5$ i $M_r = 62000$. Koji proteini i kojim redoslijedom će se eluirati iz kolone za gel-filtraciju?
4. Specifična aktivnost potpuno čistog enzima je nakon pročišćavanja iz staničnog ekstrakta porasla 75 puta. Kolika je bila količina (mg) tog enzima u sirovom ekstraktu, koji je sadržavao ukupno 200 mg proteina ako je 20 % enzima denaturirano tijekom pročišćavanja?
5. 50 mL sirovog enzimskog ekstrakta sadrži 5 mg/mL proteina. 50 μ L tog ekstrakta za 10 minuta prevede 25 μ mola odgovarajućeg supstrata u produkt. Talženjem amonijevim sulfatom uklonjeno je 70 % proteina uz gubitak 15 % aktivnosti. Nakon toga je provedena kromatografija na ionskom izmjenjivaču uz stupanj pročišćavanja 30 bez daljnjih gubitaka aktivnosti i dobiveno je 25 mL pročišćenog enzimskog preparata. Kolika je aktivnost/mL pročišćenog enzimskog preparata, a kolika njegova specifična aktivnost?
6. Za neki enzim utvrđeno je da se najlakše taloži iz otopine kod $pH 6,8$. Aminokiselinska analiza pokazala je da taj protein sadrži 4 lizina, 2 arginina, 8 metionina, 1 fenilalanin, ni jedan tirozin, 6 glutaminskih kiselina, 2 glutamina, 4 asparaginske kiseline, 8 valina, 5 izoleucina, 3 leucina, 28 glicina, 14 serina i 6 treonina. Ostale aminokiseline nisu mogle biti određene ovom analizom. Što još možete zaključiti o njegovom aminokiselinskom sastavu?
7. Pepsin je izoliran iz želučanog soka goveda pri čemu je dobiveno 100 mL ekstrakta. 40 μ L ekstrakta korišteno je za mjerenje koncentracije proteina po Lowry-u i utvrđeno je da sadrži 15 μ g proteina. Izmjereno je da se u reakcijskoj smjesi koja sadrži 10 μ L ekstrakta za 15 minuta dobije 3000 nmola produkta. Nakon toga pepsin je iz ekstrakta pročišćen talženjem amonijevim sulfatom uz stupanj pročišćavanja 5,5 i gubitak od 30 % aktivnosti, te zatim ionskom izmjenom uz stupanj pročišćavanja 17 i uz gubitak od 20 % nanesene aktivnosti. Elektroforezom je utvrđeno da je dobiveni preparat potpuno čist. Koliko je pepsina dobiveno ovim postupkom i koliki je specifični aktivitet čistog pepsina u katalima/mg?

8. Sirovi preparat enzima kisele fosfataze dobiven razbijanjem stanica kvasca sadrži 7 mg/mL proteina, a ima ukupni volumen 100 mL. Mjerenjem brzine reakcije dobiveno je da 10 μ L preparata za 5 minuta oslobodi 30 μ mola *p*-nitrofenola. Enzim je pročišćavan gel-filtracijom na koloni Sephadexa G-100 uz stupanj pročišćavanja 17,3. Nakon gel-filtracije provedena je elektroforeza na kojoj je vidljiva samo jedna proteinska vrpca. Kolika je specifična aktivnost čiste kisele fosfataze izražena u SI jedinicama?
9. Sirovi enzimski preparat sadrži 2 g proteina. Specifična aktivnost tog preparata je 10 IU/mg. Enzim je iz sirovog preparata pročišćen u dva stupnja. U prvom stupnju uklonjeno je 70 % proteina, a izgubljeno 15 % aktivnosti. U drugom stupnju provedena je ionska izmjena uz stupanj pročišćavanja 7 bez daljnjih gubitaka aktivnosti, pri čemu je sakupljeno ukupno 4 mL eluata. Koliko će molova produkta za 10 minuta proizvesti 25 μ L ovako pročišćenog enzima?
10. Sirovi enzimski preparat dobiven razbijanjem stanica kvasca sadrži 70 mg proteina, a ima ukupni volumen 100 mL. Mjerenjem brzine reakcije dobiveno je da 100 μ L preparata za 15 minuta oslobodi 45 μ mola produkta. Nakon toga enzim je pročišćavan gel-filtracijom u koloni Sephadexa G-100. Ako nam je poznato da čisti enzim ima specifičnu aktivnost 200 IU/mg, koliki treba biti stupanj pročišćavanja gel-filtracije da bi tim postupkom dobili čisti enzim?

5. REPLIKACIJA, TRANSKRIPCIJA I TRANSLACIJA

Replikacija je proces sinteze DNA u kojem dolazi do udvostručavanja DNA molekule te iz jedne molekule "majke" nastaju dvije molekule "kćeri" (shematski prikaz udvostručavanja DNA molekule dan je u udžbeniku J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 784). U procesu replikacije sudjeluje više enzima i proteina, a samu sintezu novog lanca DNA katalizira enzim **DNA-polimeraza**. Sinteza se odvija dodavanjem jednog po jednog deoksiribonukleotida u rastući lanac DNA brzinom od oko 800 nukleotida u sekundi. Novi se lanci sintetiziraju u smjeru 5'→3' reakcijom u kojoj dolazi do nukleofilnog napada 3'OH skupine zadnjeg nukleotida u lancu na α -fosfatnu skupinu dNTP-a koji ulazi u reakciju. **DNA-polimeraza** katalizira nastajanje esterske veze samo s onim nukleotidom koji sadrži bazu koja je komplementarna bazi u lancu DNA koji služi kao kalup, jer se prije sinteze esterske veze baza dolazećeg nukleotida mora spariti vodikovim vezama s odgovarajućom bazom nukleotida u lancu DNA koji služi kao kalup. Pirofosfat koji se oslobađa kao drugi produkt u ovoj reakciji se odmah hidrolizira spontano ili djelovanjem enzima **pirofosfataze** na dva ortofosfata. DNA-polimeraza osim kalupa treba i tzv. "početnicu" - kratki lanac RNA koji je već sparen sa kalupom DNA i na čiju 3'OH skupinu zadnjeg nukleotida veže sljedeći nukleotid. Naime, **DNA-polimeraza** ne može započeti sintezu lanca DNA na slobodni jednolančani kalup DNA, dok **RNA-polimeraza** ima tu sposobnost. Stoga posebna **RNA-polimeraza** (tzv. **primaza**) sintetizira kratki lanac RNA koji služi kao početnica na koju **DNA-polimeraza** nastavlja odavati nukleotide komplementarne kalupu DNA.

Genetička informacija za sintezu proteina je sadržana u DNA, međutim DNA ne sudjeluje direktno kao kalup u procesu sinteze proteina nego se informacija sadržana u DNA u proces sinteze proteina prenosi posredstvom mRNA molekula. Genetička informacija se s DNA prenosi u mRNA u procesu transkripcije (slijed nukleotida koji kodira za pojedinu aminokiselinu dan je u tablici prikazanoj u udžbeniku J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 125). Transkripcija je proces sinteze molekula RNA pri čemu je slijed nukleotida u RNA određen slijedom nukleotida u DNA. U procesu transkripcije se sintetiziraju sve vrste stanične RNA djelovanjem enzima **RNA-polimeraze**. Sinteza RNA se odvija jednakim mehanizmom reakcije i u istom smjeru (5'→3') kao i sinteza DNA. U eukariotskoj DNA se unutar sekvence strukturnoga gena mogu nalaziti dijelovi sekvence koji ne kodiraju za sintezu proteina (tzv. **introni**), pa su kodirajuće regije gena (tzv. **eksoni**) isprekidane nekodirajućim regijama. **RNA-polimeraza** ne razlikuje kodirajuće od nekodirajućih regija pa se u procesu transkripcije prepisuje cijela sekvenca gena i nastaje tzv.

primarni transkript (pre-mRNA), koji sadrži i kodirajuće i nekodirajuće regije. Prije početka translacije ovaj primarni transkript se mora modificirati (procesirati) da bi se izbacili introni, a eksoni povezali u kontinuirani slijed na osnovu kojeg će se sintetizirati protein. Procesiranje pre-mRNA odvija se u jezgri i obuhvaća proces izrezivanja introna i povezivanja eksona (tzv. "splicing") čime se dobije "zrela" mRNA.

Genetski kod je odnos između sekvencije baza u DNA (odnosno mRNA) i sekvencije aminokiselina u proteinu, pri čemu jednu aminokiselinu u proteinu kodiraju tri baze (*triplet baza* ili *kodon*) u mRNA. Aminokiseline nemaju svojstvo prepoznavanja koda koji se nalazi na mRNA pa ih u proces translacije donose specifične tRNA molekule koje služe kao adapteri. tRNA molekula se preko svog antikodona veže na odgovarajući kodon na mRNA (sparivanjem komplementarnih baza) i na taj način donosi odgovarajuću aminokiselinu za ugradnju u proteinski lanac. Informacija za prvu aminokiselinu nalazi na 5' kraju, a za zadnju na 3' kraju mRNA. Stvaranje peptidne veze između amino skupine jedne i karboksilne skupine druge aminokiseline u procesu sinteze proteina je termodinamički nepovoljno, pa se aminokiseline prije početka sinteze proteina moraju aktivirati. Aktivacija aminokiselina odvija se pomoću ATP-a u reakcijama koje kataliziraju specifični enzimi, **aminoacil-tRNA sintetaze**, a zatim se aktivirana aminokiselina veže na tRNA tako da nastaju aminoacil-tRNA (struktura aminoacil-tRNA prikazana je u udžbeniku J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 862). Prvi korak u reakciji aktivacije aminokiseline je nastajanje aminoacil-adenilata reakcijom aminokiseline i ATP. Ova aktivirana molekula je miješani anhidrid koji nastaje vezanjem karboksilne skupine aminokiseline na fosforilnu skupinu AMP-a. U sljedećem koraku, koji katalizira isti enzim, aminoacilna skupina se prebacuje na molekulu tRNA i to na 2'OH ili 3'OH skupinu riboze na 3'-kraju molekule tRNA, pri čemu nastaje esterska veza, a AMP iz molekule aminoacil-adenilata oslobađa se kao drugi produkt reakcije.

Translacija počinje sklapanjem inicijacijskog kompleksa koji sadrži malu i veliku podjedinicu ribosoma, mRNA i inicijacijsku tRNA s prvom aminokiselinom. Inicijacijska tRNA (kod prokariota fMet-tRNA_f, a kod eukariota Met-tRNA_i) na malu podjedinicu dolazi u kompleksu s odgovarajućim inicijacijskim faktorom (IF2 kod prokariota, eIF2 kod eukariota). IF2 i eIF2 vežu na sebe molekulu GTP-a koju zatim hidroliziraju na GDP i P_i, a ovisno o tome jesu li u kompleksu s molekulom GTP-a ili GDP-a poprimaju različite konformacije. IF2 i eIF2 s vezanim GTP-om imaju konformaciju koja može vezati inicijacijsku tRNA, a nakon hidrolize GTP-a mijenjaju konformaciju te gube sposobnost vezanja inicijacijske tRNA. Ostale aminoacil-tRNA na ribosom dolaze u kompleksu s elongacijskim faktorom EF-T_u, koji je sličan

IF2 po tome što ima mjesto za vezanje GTP-a i GTP-aznu aktivnost. EF-T_u u kompleksu s GTP-om veže aminoacil-tRNA, a nakon što se GTP pocijepa na GDP i P_i mijenja konformaciju i otpušta se iz kompleksa s aminoacil-tRNA. EF-T_u smješta aminoacil-tRNA u A mjesto na ribosomu. Nakon što se aminoacil-tRNA veže svojim antikodonom na kodon mRNA koji se nalazi u A mjestu, dolazi do hidrolize GTP-a i otpuštanja EF-T_u. α-amino skupina aminokiseline smještene u A mjestu nukleofilno napada estersku vezu između rastućeg polipeptidnog lanca i tRNA na koju je on vezan u P mjestu. Pri tome dolazi do stvaranja tetraedarskog međuproducta nakon čega se rastući polipeptidni lanac prebacuje na tRNA u A mjestu, a tRNA iz P mjesta ostaje slobodna. Sintezu peptidne veze katalizira enzim *peptidil-transferaza* (sastavni je dio 50S podjedinice) uz pomoć rRNA iz 50S podjedinice. Sljedećim korakom cijeli ribosom se pomakne po lancu mRNA da bi se u A mjesto smjestio novi kodon s informacijom za sljedeću aminokiselinu koju treba ugraditi. Za pomak ribosoma po lancu mRNA potreban je elongacijski faktor EF-G, koji također veže GTP i ima GTP-aznu aktivnost te mijenja konformaciju ovisno o tome je li na njega vezan GTP ili GDP. EF-G s vezanim GTP-om veže se uz A mjesto na velikoj podjedinici ribosoma, nakon čega hidrolizira GTP-a i promijeni konformaciju. Ova promjena konformacije uzrokuje pomak ribosoma po lancu mRNA za tri nukleotida i ujedno pomak tRNA na maloj podjedinici, tako da se u obje podjedinice ribosoma tRNA koja je bila u A mjestu prebaci u P mjesto, a ona iz P-mjesta u E mjesto, dok A mjesto ostaje slobodno. Stoga je za vezanje jedne aktivirane aminokiseline u proteinski lanac potrebno utrošiti dvije molekule GTP-a – jednu za donošenje aminoacil-tRNA u A mjesto i jednu za pomicanje ribosoma na sljedeći kodon u lancu mRNA (proces prikazan shematski u udžbeniku J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 872).

Do terminacije translacije dolazi kada se na mRNA pojavi *stop* kodon (UAA, UAG ili UGA), jer u stanici nema tRNA koja bi se mogla vezati na taj kodon. Umjesto tRNA se tada na ribosom vežu “faktori otpuštanja” (RFs) koji aktiviraju hidrolitičku aktivnost peptidil-transferaze, što dovodi do cijepanja esterske veze između tRNA i polipeptida i gotovi proteinski lanac se otpušta s ribosoma. Nakon odcijepljena proteinskog lanca “oslobađajući faktori” RRF (“ribosome release factor”) i EF-G koriste energiju hidrolize GTP-a za disocijaciju velike i male podjedinice ribosoma i otpuštanje mRNA, čime je proces sinteze proteina završen.

Sumarno, za svaku aminokiselinu koja se uključuje u proces sinteze proteina stanica troši po jednu molekulu ATP-a (ali po dvije visokoenergetske veze jer kao produkt reakcije nastaje AMP) u procesu aktivacije aminokiseline. Nadalje, troši jednu molekulu GTP-a za vezanje inicijacijske tRNA u P mjesto i nakon toga još po dvije molekule GTP-a za svaku sljedeću aminokiselinu koja će se vezati u polipeptidni lanac - jednu za donošenje aminoacil-

tRNA u A mjesto i jednu za pomicanje ribosoma na sljedeći kodon u lancu mRNA. Primjer utroška molekula ATP-a i GTP-a, odnosno visokoenergetskih veza, za sintezu proteina koji se sastoji od 100 aminokiselinskih ostataka dan je u Tablici 3.

Tablica 3. Broj molekula ATP-a i GTP-a, odnosno visokoenergetskih veza, potrošenih za sintezu proteina duljine 100 aminokiselinskih ostataka.

| faza procesa sinteze proteina | broj molekula ATP-a | broj molekula GTP-a | broj visokoenergetskih veza |
|--|---------------------|---------------------|-----------------------------|
| aktivacija aminokiselina | 100 | 0 | 200 |
| inicijacija translacije | 0 | 1 | 1 |
| vezanje aminoacil-adenilata na ribosom | 0 | 99 | 99 |
| translokacija ribosoma | 0 | 99 | 99 |
| ukupno: | 100 | 199 | 399 |

Primjeri zadataka - replikacija, transkripcija i translacija

1. primjer

Koliku će molarnu masu imati "zrela" eukariotska mRNA nastala transkripcijom strukturnog gena koji sadrži 55 % introna, a dugačak je 6000 parova baza (pb)? Prosječna Mr nukleotida iznosi 340.

Rješenje:

Modifikacija pre-mRNA, tzv. "splicing", uključuje izrezivanje nekodirajućih sekvenci, introna i povezivanje kodirajućih sekvencija, eksona, čime se dobije zrela mRNA. Ako je udio introna 55 % onda broj kodirajućih parova baza čini 45 % duljine primarnog transkripta. Broj kodirajućih pb stoga iznosi:

$$6000 \times 0,45 = 2700$$

Molarnu masu zrele mRNA dobijemo množenjem broja nukleotida s njihovom prosječnom molarnom masom.

$$2700 \times 340 = 918\ 000$$

Molarna masa zrele mRNA iznosi 918 000.

2. primjer

Koliko parova baza sadrži cijeli genom *E. coli* ako znate da se u stanici može sintetizirati najviše 2050 različitih proteina prosječne molekulske mase 40 000, a samo 70 % genoma kodira za proteine (prosječna Mr aminokiseline je 110)?

Rješenje:

Najprije treba izračunati ukupan broj aminokiselina u prosječnom proteinu, a zatim u svim vrstama molekula proteina koje stanica sintetizira. Broj aminokiselina u proteinu dobije se dijeljenjem Mr proteina sa prosječnom Mr aminokiseline:

$$\frac{40000}{110} = 363,6$$

Dobiveni broj zaokružiti ćemo na cijeli broj od 363 aminokiseline i pomnožiti ga s brojem različitih vrsta proteina u stanici kako bi dobili broj aminokiselina u svim proteinima:

$$363 \times 2050 = 744\ 150$$

Nakon toga možemo izračunati koliko je nukleotida u DNA potrebno za kodiranje tolikog broja aminokiselina. Broj kodirajućih nukleotida za sve proteine dobije se množenjem broja aminokiselina sa 3 jer za svaku aminokiselinu kodiraju 3 nukleotida:

$$744\ 150 \times 3 = 2\ 232\ 450$$

S obzirom na to da znamo da 70 % genoma kodira za proteine sada možemo izračunati koliko je velik cijeli genom.

$$\frac{2\ 232\ 450}{0,7} = 3\ 189\ 214$$

Ukupni broj parova baza u genomu iznosi 3 189 214.

3. primjer

Koliko mg DNA bi se moglo izolirati iz 100 mL stanične kulture bakterije koja sadrži 10^9 stanica/mL? Cjelokupni genom bakterije kodira za 3000 različitih proteina prosječne molekulske mase 40000, te sadrži 50 % DNA koja ne kodira za proteine. Prosječna molekulska masa para nukleotida iznosi 640, a aminokiseline 110.

Rješenje:

Najprije treba izračunati prosječan broj aminokiselina u jednom proteinu, pa ukupan broj aminokiselina u svim vrstama proteina.

broj aminokiselina u proteinu: $\frac{40\ 000}{110} = 363,6 = 363$

broj aminokiselina u svim proteinima: $363 \times 3000 = 1,089 \times 10^6$

Iz toga možemo izračunati potreban broj kodirajućih nukleotida i ukupni broj parova baza u genomu.

broj kodirajućih nukleotida: $1,089 \times 10^6 \times 3 = 3,267 \times 10^6$

ukupni broj pb u genomu: $\frac{3,267 \times 10^6}{0,5} = 6,534 \times 10^6$

Molekulsku masu molekule DNA možemo izračunati tako da broj parova baza pomnožimo s prosječnom molekulskom masom para baza.

$$6,534 \times 10^6 \times 640 \frac{g}{mol} = 4,18 \times 10^9 \frac{g}{mol}$$

Masa jedne molekule DNA (jedne kopije genoma) dobije se dijeljenjem Mr molekule DNA sa Avogadrovim brojem:

$$\frac{4,18 \times 10^9 \frac{g}{mol}}{6,022 \times 10^{23} mol^{-1}} = 6,944 \times 10^{-15} g$$

Broj stanica u 100 mL bakterijske kulture iznosi:

$$100 \times 10^9 = 10^{11}$$

Budući da svaka stanica sadrži jednu kopiju genoma, onda je ukupna masa izolirane DNA iz 100 mL kulture:

$$6,944 \times 10^{-15} g \times 10^{11} = 0,0007 g = 0,7 mg$$

4. primjer

Koliko se visokoenergetskih veza (vev) utroši za sintezu 10 molekula nekog proteina molekulske mase 22000 (prosječna Mr aminokiseline je 110)?

Rješenje:

Najprije trebamo izračunati koliki je broj aminokiselina u proteinu:

$$\frac{22\ 000}{110} = 200$$

Nakon toga možemo izračunati koliko se visokoenergetskih veza troši za aktivaciju aminokiselina, inicijaciju i elongaciju translacije. Za aktivaciju svake aminokiseline troši se jedan ATP, ali dvije visokoenergetske veze (vev):

$$200 \times 2 = 400$$

Za inicijaciju translacije troši se jedan GTP (1 vev), pri čemu se na ribosom veže i prva aminokiselina, a u procesu elongacije se za svaku sljedeću aminokiselinu troše 2 GTPa – jedan za donošenje aminoacil-tRNA u A mjesto i jedan za translokaciju ribosoma:

$$199 \times 2 = 398$$

Broj ukupno utrošenih visokoenergetskih veza za jednu molekulu proteina stoga iznosi:

$$400 + 1 + 398 = 799$$

Ukupno utrošen broj visokoenergetskih veza za 10 molekula proteina iznosi:

$$799 \times 10 = 7900$$

Za sintezu 10 molekula ovog proteina utroši se 7900 visokoenergetskih veza (4000 iz 2000 molekula ATP-a i 3900 iz GTP-a).

5. primjer

Koliko je ATP-a, koliko GTP-a, a koliko energijom bogatih veza, potrebno za biosintezu proteina molekulske mase 30000 ako sinteza počinje od slobodnih aminokiselina, tRNA, mRNA i ribosoma (prosječna M_r aminokiseline = 110)?

Rješenje:

broj aminokiselina u proteinu: $\frac{30\,000}{110} = 272$

aktivacija aminokiselina (1ATP, 2 visokoenergetske veze (vev)): $272 \times 2 = 544$

inicijacija translacije (1GTP = 1vev): 1

elongacija – za svaku aminokiselinu u procesu elongacije troše se 2 GTPa: $271 \times 2 = 542$

Ukupno visokoenergetskih veza:

$$544 + 1 + 542 = 1087$$

Ukupan broj ATP-a: 272

Ukupan broj GTP-a: 543

6. primjer

Za sintezu 5 molekula nekog proteina utrošeno je 5095 molekula GTP-a. Kolika je Mr tog proteina i koliko je još visokoenergetskih veza stanica morala potrošiti za navedenu sintezu? (prosječna Mr aminokiseline je 110).

Rješenje:

Broj visokoenergetskih veza utrošenih za jednu molekulu proteina iznosi:

$$\frac{5095}{5} = 1019$$

Od toga je za inicijaciju translacije potrošena jedna visokoenergetska veza (1GTP), što znači da je preostalih 1018 veza potrošeno za elongaciju. Obzirom da se u elongaciji za svaku dodanu aminokiselinu troše po dvije visokoenergetske veze (2 GTP-a) možemo izračunati da je broj aminokiselina dodanih u elongaciji:

$$\frac{1018}{2} = 509$$

Stoga je ukupni broj aminokiselina 510 jer se prva aminokiselina veže prilikom inicijacije te je dodano još 509 aminokiselina tijekom elongacije. Mr protina prema tome iznosi:

$$510 \times 110 = 56\,100$$

Stanica je još morala utrošiti po dvije visokoenergetske veze za aktivaciju svake aminokiseline što za 5 molekula proteina iznosi ukupno 5100 visokoenergetskih veza:

$$510 \times 2 \times 5 = 5100$$

Zadatci za vježbu - replikacija, transkripcija i translacija

1. Kolika je ukupna masa DNA u 50 mL stanične kulture kvasca koja sadrži 10^8 stanica/mL? Cjelokupni genom kvasca kodira za 6600 različitih proteina prosječne molekulske mase 35000, a 35 % genoma ne kodira za proteine? Prosječna molekulska masa para nukleotida iznosi 640, a aminokiseline 110.
2. Izračunajte koliko se ukupno energije (kJ) utroši za sintezu 1 μg proteina čija je M_r 85000? (prosječna M_r aminokiseline je 110; $\Delta G^0_{\text{hidrolize ATP}} = -30,5 \text{ kJ/mol}$; $\Delta G^0_{\text{hidrolize GTP}} = -30,5 \text{ kJ/mol}$).
3. Naznačite koje su od sljedećih tvrdnji o mRNA točne, a koje netočne. Netočne tvrdnje ukratko objasnite:
 - a) pre-mRNA eukariota može sadržavati introne,
 - b) mRNA sadrži deoksiribozu,
 - c) mRNA je produkt translacije,
 - d) prokariotska mRNA ima poli(A)rep na 3' kraju,
 - e) susjedni nukleotidi u mRNA su međusobno povezani anhidridnim vezama,
 - f) mRNA tijekom translacije stupa u interakcije s tRNA,
 - g) mRNA je produkt reakcije katalizirane RNA-polimerazom,
 - h) eukariotska mRNA ima vezan 7-metilguanilat na 3' kraju.
4. Naznačite koje su od sljedećih tvrdnji o DNA točne, a koje netočne. Objasnite netočne tvrdnje:
 1. sinteza DNA se u stanicama eukariota odvija u citoplazmi;
 2. DNA se udvostručava u procesu replikacije;
 3. deoksiribonukleotidi se prije replikacije moraju aktivirati s ATP-om;
 4. greške u procesu replikacije ispravlja DNA-polimeraza;
 5. supstrat DNA-polimeraze su deoksiribonukleozidi;
 6. temperatura taljenja DNA raste s porastom udjela GC parova.
5. Napišite strukturnim formulama dio lanca mRNA koji se sintetizira pri transkripciji dijela nekodirajućeg lanca čija je sekvenca $5'\text{dAdGdC}3'$.
6. Veličina genoma *E. coli* iznosi $3,2 \times 10^6$ parova baza, od čega 30 % ne kodira za proteine. Koliko bi se različitih proteina prosječne molekulske mase 40000 moglo sintetizirati u ovakvoj stanici *E. coli*?
7. Naznačite koje su od sljedećih tvrdnji točne, a koje netočne:
 1. tRNA se sintetizira u reakciji koju katalizira aminoacil-tRNA sintetaza;
 2. tRNA se acetilira u reakciji koju katalizira aminoacil-tRNA sintetaza;
 3. tRNA sadrži neke nukleotide kojih nema u sastavu drugih vrsta nukleinskih kiselina;
 4. inicijacijski i elongacijski faktori su proteinske molekule;

5. prekursori za sintezu rRNA su ribonukleotidi;
 6. tRNA i aminokiselina su u aminoacil-tRNA povezane anhidridnom vezom;
 7. energija potrebna za pomicanje ribosoma po lancu mRNA dobiva se hidrolizom GTP-a.
8. Mr nekog eukariotskog proteina iznosi 110000. Kolika će biti Mr: a) dijela mRNA koji se translacija; b) strukturnog gena koji kodira za ovaj protein ako se radi o eukariotskoj stanici pri čemu gen sadrži 40 % intronskih sekvenci? (prosječna Mr aminokiseline je 110, a nukleotida 340).
 9. Koliko je ATP-a, a koliko energijom bogatih veza, potrebno za biosintezu proteina čija je Mr 25000, ako sinteza počinje od slobodnih aminokiselina, tRNA, mRNA i ribosoma (prosječna Mr aminokiseline = 110)?
 10. Kolika je Mr proteina koji sadrži 15 AUG kodona u genu koji kodira za taj protein ako hidrolizat tog proteina sadrži jednak udio svih aminokiselina (prosječna Mr aminokiseline je 110)?
 11. Napišite slijed aminokiselina u početnom (N-terminalnom) dijelu proteina kodiranoga genom unutar sljedeće sekvence dijela DNA te naznačite koji je od lanaca u prikazanom dijelu DNA kodirajući:

5' CTTGGAATATGGACCTTCACTGG 3'

3' GAACCTTATACCTGGAAGTGACC 5'
 12. Neki protein ima Mr 24500 i poznato je da u primarnoj strukturi na položaju 164 ima ostatak triptofana. Kako bi se na primarnu strukturu tog proteina odrazile mutacije kojima bi se druga baza u tripletu koji kodira za triptofan zamjenila: 1. adeninom; 2. citidinom? Kakve bi bile posljedice navedenih mutacija na Mr tog proteina u 1. odnosno u 2. slučaju? Za odgovore na pitanja koristite tablicu genetičkog koda (prosječna Mr aminokiseline je 110).
 13. 55 % genoma stanice koji se sastoji od 13×10^6 parova baza kodira za proteine, a prosječna Mr proteina iznosi 40 000 (prosječna Mr aminokiseline = 110). Ako ukupna količina proteina u stanici iznosi 30 % suhe tvari, kolika se prosječna masa jednog prosječno zastupljenog proteina može očekivati po gramu biomase?
 14. Koliko je grama ATP-a potrebno za biosintezu 1 mg proteina čija je Mr 40000 počevši od mRNA i slobodnih aminokiselina (Mr aminokiseline = 110, Mr ATP-a = 507)?
 15. Koliko se molekula GTP-a, a koliko ukupno energetski bogatih veza utroši za biosintezu proteina (počevši od slobodnih aminokiselina) u nekoj bakterijskoj stanici koja sintetizira 4000 različitih proteina prosječne Mr 40000, ako je prosječan broj kopija svakog proteina 2500? (prosječna Mr aminokiselina iznosi 110)

6. BIOKEMIJSKA TERMODINAMIKA

6.1. Promjena slobodne energije (ΔG) u enzimskim reakcijama

Energija je sposobnost sustava da obavi neki rad. Živi organizmi moraju obavljati određeni biološki rad (kemijski, osmotski, mehanički) da bi živjeli, a energiju za njegovo obavljanje uzimaju iz okoline (kemijska energija iz hrane, svjetlosna energija Sunca). Dobivenu energiju različitim kemijskim procesima, koje zovemo metabolizmom, pretvaraju i iskorištavaju za provođenje staničnih procesa. Biološke transformacije energije podliježu zakonima termodinamike kao i sve ostale promjene energije u prirodi. Prema prvom zakonu termodinamike ukupna je energija sustava i njegove okoline konstantna (energija se samo prevodi iz jednog oblika u drugi, ne može nastati niti nestati). Drugi zakon termodinamike kaže da se neki proces može odvijati spontano samo ako zbroj entropije sustava i njegove okoline poraste, tj. ako se povećava ukupni stupanj neuređenosti (živi organizmi tvore uređene strukture, ali pri tome se povećava neuređenost okoline pa je ukupna promjena entropije pozitivna). Budući da promjena entropije nije lako mjerljiva i stoga prikladna za određivanje spontanosti biokemijskih procesa, u tu svrhu koristi se termodinamička funkcija *slobodna energija* (Willard Gibbsova termodinamička funkcija). U uvjetima konstantnog tlaka i temperature promjena slobodne energije sustava u kojem se zbivaju kemijske reakcije povezana je s promjenom entropije, a ovisi o prirodi reaktanata i razlici energije početnog i ravnotežnog stanja. U spontanim reakcijama produkti imaju manje slobodne energije od reaktanata pa se u reakciji oslobađa energija (egzergona reakcija). Reakcije u kojima produkti sadrže više energije nego reaktanti za odvijanje zahtjevaju unos energije (endergone reakcije) i nisu spontane.

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

ΔG promjena slobodne energije

ΔH promjena entalpije

ΔS promjena entropije

T temperatura [izražena u Kelvinima]

Kada je $\Delta G < 0$ reakcija se spontano odvija (egzergona reakcija), reakcija je termodinamički povoljna.

Kada je $\Delta G = 0$ reakcija je u ravnoteži.

Kada je $\Delta G > 0$ reakcija se ne može spontano odvijati (endergonna reakcija), reakcija je termodinamički nepovoljna.

Kada je $\Delta H < 0$ sustav oslobađa toplinu (egzotermna reakcija)

Kada je $\Delta H > 0$ sustav apsorbira toplinu (endotermna reakcija)

Kada je $\Delta S < 0$ povećava se uređenost sustava

Kada je $\Delta S > 0$ smanjuje se uređenost sustava

ΔG ovisi o razlici slobodne energije produkata i reaktanata, a ne ovisi o putu odvijanja reakcije.

U nestandardnim uvjetima ΔG ovisi i o reakcijskim uvjetima i koncentracijama reaktanata i produkata.



$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + RT \ln \frac{[C] [D]}{[A] [B]}$$

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + 2,303 RT \log \frac{[C] [D]}{[A] [B]}$$

- u ravnoteži je $\Delta G = 0$ pa je $\Delta G^{\circ} = -RT \ln K'$

$$K' = 10^{\frac{-\Delta G^{\circ}}{2,303 RT}} = 10^{\frac{-\Delta G^{\circ}}{5,67}}$$

ΔG° ... standardna promjena slobodne energije

K' ... konstanta ravnoteže reakcije u standardnim uvjetima

R ... opća plinska konstanta ($8,31 \times 10^{-3}$ kJ/K mol)

T ... temp. (K)

Standardna promjena slobodne energije ΔG° je promjena slobodne energije u standardnim uvjetima tj. pri $T = 298 \text{ }^{\circ}\text{K}$ ($25 \text{ }^{\circ}\text{C}$), $\text{pH} = 7.0$ i 1 M koncentraciji reaktanata.

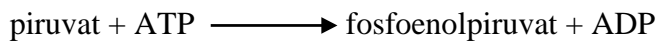
Primjeri zadataka – ΔG^0 u enzimskim reakcijama

1. primjer

Izračunajte promjenu standardne slobodne energije, ΔG^0 , za praktički ireverzibilnu reakciju glikolize koju katalizira piruvat kinaza, za slučaj kad bi se ona odvijala u suprotnome smjeru. ΔG^0 za pretvorbu fosfoenolpiruvata (PEP) u piruvat (Pyr) iznosi $-31,4$ kJ/mol, a za hidrolizu ATP-a na ADP i P_i iznosi $-30,5$ kJ/mol.

Rješenje:

Reakcija koju katalizira piruvat kinaza bi se u suprotnom smjeru odvijala na sljedeći način:



$$\Delta G^0_{\text{PEP/Pyr}} = -31,4 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta G^0_{\text{ATP/ADP}} = -30,5 \text{ kJ/mol}$$

Promjena slobodne energije ΔG^0 za pretvorbu piruvata u fosfoenolpiruvat je jednaka po iznosu, ali suprotnog predznaka:

$$\Delta G^0_{\text{Pyr/PEP}} = 31,4 \text{ kJ/mol}$$

Ukupna promjena slobodne energije u toj reakciji jednaka je sumi promjena slobodne energije pretvorbe Pyr u PEP i hidrolize ATP na ADP i P_i :

$$\Delta G^0 = \Delta G^0_{\text{Pyr/PEP}} + \Delta G^0_{\text{ATP/ADP}}$$

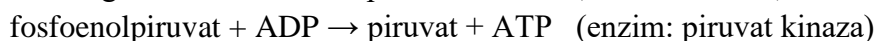
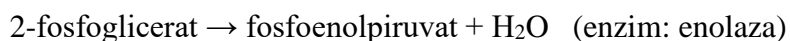
$$\Delta G^0 = 31,4 \text{ kJ/mol} + (-30,5 \text{ kJ/mol}) = 0,9 \text{ kJ/mol}$$

2. primjer

Ako je ΔG^0 reakcije pretvorbe 2-fosfoglicerata u piruvat $-29,7$ kJ/mol, a reakcije koju katalizira enolaza $1,7$ kJ/mol, kolika je ΔG^0 reakcije koju katalizira piruvat kinaza?

Rješenje:

Pretvorba 2-fosfoglicerata u piruvat odvija se putem dviju uzastopnih enzimskih reakcija, pri čemu prvu reakciju katalizira enzim enolaza, a drugu enzim piruvat kinaza.



Ukupna promjena slobodne energije prilikom pretvorbe 2-fosfoglicerata u piruvat jednaka je sumi promjene slobodne energije prve i druge reakcije:

$$\Delta G^0 = \Delta G^0_{(\text{enolaza})} + \Delta G^0_{(\text{piruvat kinaza})}$$

Stoga se promjena slobodne energije za reakciju koju katalizira piruvat kinaza može izračunati kao razlika ukupne promjene slobodne energije u ovoj pretvorbi i promjene slobodne energije reakcije koju katalizira enolaza:

$$-29,7 = 1,7 + \Delta G^0 \text{ (piruvat kinaza)}$$

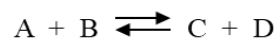
$$\Delta G^0 \text{ (piruvat kinaza)} = -29,7 - 1,7$$

$$\Delta G^0 \text{ (piruvat kinaza)} = -31,4 \text{ kJ/mol}$$

3. primjer

Izračunajte ravnotežni omjer koncentracija fosfoenolpiruvat/piruvat u standardnim uvjetima ako je omjer koncentracija ATP/ADP = 10. ΔG^0 reakcije koju katalizira piruvat kinaza iznosi -31,4 kJ/mol.

Rješenje:



$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

$$\Delta G = \Delta G^0 + 2,303 RT \log \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

Promjena slobodne energije (ΔG) reakcije ovisi o prirodi reaktanata (izraženo u gornjoj jednačini). Ukoliko je promjena slobodne energije negativna reakcija se događa spontano, a ukoliko je ΔG pozitivan reakcija se ne može dogoditi. Ako je $\Delta G = 0$ sustav je u ravnoteži pa je:

$$\Delta G^0 = -2,303 RT \log \frac{[Pyr][ATP]}{[PEP][ADP]}$$

$$-31,4 = -2,303 \times 8,314 \times 10^{-3} \times 298,15 \times \left(\log \frac{[Pyr]}{[PEP]} + \log \frac{[ATP]}{[ADP]} \right)$$

$$-31,4 = -2,303 \times 8,314 \times 10^{-3} \times 298,15 \times \left(\log \frac{[Pyr]}{[PEP]} + \log 10 \right)$$

$$-31,4 = -5,71 \times \left(\log \frac{[Pyr]}{[PEP]} + 1 \right)$$

$$5,5 = \log \frac{[Pyr]}{[PEP]} + 1$$

$$4,5 = \log \frac{[Pyr]}{[PEP]}$$

$$\frac{[Pyr]}{[PEP]} = 3,15 \times 10^4$$

$$\text{Ravnotežni omjer } \frac{[PEP]}{[Pyr]} = (3,15 \times 10^4)^{-1} = 3,17 \times 10^{-5}$$

Zadatci za vježbu – ΔG^0 u enzimskim reakcijama

1. Naznačite i objasnite koje su od sljedećih tvrdnji netočne:
 - a) ako je ΔG^0 negativan reakcija je egzotermna,
 - b) $\Delta G^0 = 0$ kada je konstanta ravnoteže reakcije $K' = 1$,
 - c) kada je $K' > 1$ reakcija se u standardnim uvjetima odvija spontano,
 - d) ukupna ΔG^0 u nizu reakcija jednaka je razlici ΔG^0 pojedinih reakcija,
 - e) spontanost reakcije u realnim (nestandardnim) uvjetima ovisi o koncentracijama reaktanata i produkata reakcije,
 - f) ΔG^0 je obrnuto proporcionalna brzini reakcije,
 - g) vrijednost ΔG^0 ovisi o putu odvijanja reakcije.
2. Izračunajte i objasnite kolika je najveća moguća koncentracija fruktoza-6-fosfata pri kojoj reakcija koju katalizira fosfoglukozna izomeraza teče u smjeru izomerizacije glukoza-6-fosfata u fruktoza-6-fosfat, ako se reakcija odvija pri temperaturi od $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz koncentraciju glukoza-6-fosfata $1,4\text{ mM}$? ΔG^0 za reakciju koju katalizira fosfoglukozna izomeraza iznosi $1,7\text{ kJ/mol}$.
3. Izračunajte i objasnite kolika je najniža koncentracija glukoza-6-fosfata potrebna da bi reakcija koju katalizira fosfoglukozna izomeraza tekla u smjeru izomerizacije glukoza-6-fosfata u fruktoza-6-fosfat, ako je koncentracija fruktoza-6-fosfata $0,5\text{ mM}$, a reakcija se odvija pri temperaturi od $30\text{ }^{\circ}\text{C}$? ΔG^0 za reakciju koju katalizira fosfoglukozna izomeraza iznosi $1,7\text{ kJ/mol}$.
4. Izračunajte i objasnite kolika treba biti najmanja koncentracija 3-fosfoglicerata da bi reakcija koju katalizira fosfoglicerat mutaza tekla u smjeru pretvorbe 3-fosfoglicerata u 2-fosfoglicerat, ako se reakcija odvija pri temperaturi od $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz koncentraciju 2-fosfoglicerata od $1,4\text{ mM}$? ΔG^0 reakcije iznosi $4,6\text{ kJ/mol}$.
5. Izračunajte kolika je ΔG^0 reakcije pretvorbe 2-fosfoglicerata u 3-fosfoglicerat ako je ΔG^0 pretvorbe 3-fosfoglicerata u fosfoenolpiruvat $6,3\text{ kJ/mol}$, a ΔG^0 reakcije dehidratacije 2-fosfoglicerata $1,7\text{ kJ/mol}$.
6. Ako je ΔG^0 reakcije koju katalizira alanin transaminaza $-1,0\text{ kJ/mol}$, a reakcije koju katalizira aspartat transaminaza $-4,81\text{ kJ/mol}$, izračunajte ΔG^0 za reakciju sinteze alanina (Ala) i oksaloacetata (OAA) iz aspartata (Asp) i piruvata (Pyr). Objasnite je li ova reakcija spontana uz koncentracije reaktanata $[\text{Pyr}] = [\text{Asp}] = 10^{-2}\text{ M}$, $[\text{Ala}] = 10^{-4}\text{ M}$, $[\text{OAA}] = 10^{-5}\text{ M}$ pri standardnoj temperaturi i tlaku?
7. Promjena standardne slobodne energije (ΔG^0) za reakciju glikolize koju katalizira fosfoglicerat kinaza je $-18,8\text{ kJ/mol}$. Izračunajte kolika je ΔG^0 fosforilacije 3-fosfoglicerata, ako je ΔG^0 fosforilacije ADP-a $30,5\text{ kJ/mol}$?

8. Izračunajte kolika je najveća moguća koncentracija gliceraldehid-3-fosfata pri kojoj reakcija koju katalizira triozafosfat izomeraza teče u smjeru izomerizacije dihidroksiacetonfosfata u gliceraldehid-3-fosfat, ako se reakcija odvija pri temperaturi od 37 °C uz koncentraciju dihidroksiacetonfosfata od 2,4 mM? ΔG^0 za reakciju koju katalizira triozafosfat izomeraza iznosi 7,5 kJ/mol.
9. Izračunajte i objasnite kolika treba biti najmanja moguća koncentracija dihidroksiacetonfosfata pri kojoj teče reakcija izomerizacije dihidroksiacetonfosfata u gliceraldehid-3-fosfat, ako se reakcija odvija pri temperaturi od 35 °C uz koncentraciju gliceraldehid-3-fosfata od 1,4 mM? ΔG^0 reakcije iznosi 7,5 kJ/mol.
10. Ako je ΔG^0 reakcije pretvorbe fumarata u oksaloacetat 25,9 kJ/mol, a ΔG^0 reakcije redukcije oksaloacetata u malat -29,7 kJ/mol, kolika je ΔG^0 hidratacije fumarata?
11. Izračunajte kolika je ΔG^0 reakcije koju katalizira malat dehidrogenaza u uvjetima kada je nizak omjer ATP/ADP i NADH/NAD⁺, ako je ΔG^0 oksidacije malata u oksaloacetat -32,05 kJ/mol, a ΔG^0 oksidacije NADH -61,75 kJ/mol.
12. Izračunajte ukupni ΔG^0 pretvorbe fosfoenolpiruvata u laktat, ako je ΔG^0 pretvorbe fosfoenolpiruvata u piruvat -106 kJ/mol, ΔG^0 oksidacije laktata u mišiću 67 kJ/mol, ΔG^0 fosforilacije ADP-a u ATP 32 kJ/mol, a ΔG^0 redukcije NAD⁺ 219 kJ/mol.

6.2. Redoks-potencijal i promjena slobodne energije u enzimskim reakcijama

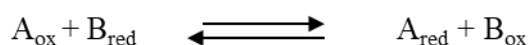
Ako se u otopini nalaze dva redoks para, elektroni spontano prelaze s elektron donora jednog para na elektron akceptor drugog para. Smjer prijenosa elektrona ovisi o afinitetu akceptora svakog od redoks parova za elektrone, tj. o redoks-potencijalu parova koji sudjeluju u reakciji. Redoks-potencijal E_0' (potencijal za prijenos elektrona) nekog redoks para određuje se mjerenjem elektromotorne sile odgovarajuće elektrode (metalna elektroda uronjena u otopinu oksidansa i reducensa u 1M koncentracijama) u odnosu prema standardnoj elektrodi (platinska elektroda uronjena u 1M otopinu H^+ u ravnoteži s plinovitim H_2 ($p = 1 \text{ atm}$)). U realnim uvjetima redoks-potencijal, odnosno razlika redoks-potencijala, se može izračunati pomoću jednadžbi:

$$E = E_0' - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[A_{\text{red}}]}{[A_{\text{ox}}]}$$

$$\Delta E = \Delta E_0' - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[A_{\text{red}}][B_{\text{ox}}]}{[A_{\text{ox}}][B_{\text{red}}]}$$

F ... Faradayeva konstanta (96,487 kJ/Vmol)
 n ... broj elektrona
 R ... opća plinska konstanta ($8,31 \times 10^{-3}$ kJ/K mol)
 T ... Temp. (K)

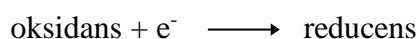
U sustavu akceptora i donora elektrona, $\Delta E_0'$ možemo izračunati kao razliku redoks-potencijala redoks parova akceptora i donora elektrona:



$$\Delta E_0' = E_0'(A_{\text{ox/red}}) - E_0'(B_{\text{ox/red}})$$

akceptor e^- donor e^-

Prema konvenciji redoks-potencijali se odnose na parcijalne reakcije:



Na osnovu poznatih standardnih redoks-potencijala ($\Delta E_0'$) može se izračunati ΔG^0 oksidoredukcijske reakcije:

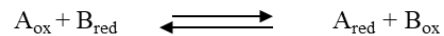
$$\Delta G^0 = -nF\Delta E_0'$$

Primjeri zadataka - redoks-potencijal i promjena slobodne energije

1. primjer

Tijekom prijenosa 14 elektrona sa sustava s redoks-potencijalom $E_0' = +0,31$ V na sustav sa redoks-potencijalom $E_0' = +0,43$ V oslobađa se energija. Izračunajte koliko se molova ATP može sintetizirati na račun te energije (ΔG^0 hidrolize ATP = -30,5 kJ/mol).

Rješenje:



$$\Delta E_0' = E_0'(\text{A}_{\text{ox/red}}) - E_0'(\text{B}_{\text{ox/red}})$$

akceptor e^- donor e^-

Sustav sa redoks-potencijalom $E_0' = +0,43$ V je akceptor, a sustav sa redoks-potencijalom $E_0' = +0,31$ V je donor elektrona, pa je razlika elektrodnog potencijala:

$$\Delta E_0' = 0,43 - (+0,31) = 0,12 \text{ V}$$

Korištenjem jednadžbe $\Delta G^0 = -nF\Delta E_0'$ može se izračunati koliko se energije u ovom sustavu oslobodi prijenosom 14 elektrona:

$$\Delta G^0 = -14 \times 96,487 \text{ kJ/Vmol} \times 0,12 \text{ V}$$

$$\Delta G^0 = -162,1 \text{ kJ/mol}$$

Za sintezu ATP-a potrebno je utrošiti energiju od 30,5 kJ/molu

$$\frac{162,1 \text{ kJ/mol}}{30,5 \text{ kJ/mol}} = 5,3$$

Na račun oslobođene energije može se sintetizirati najviše 5 molova ATP-a.

2. primjer

Izračunajte oslobađa li se više energije oksidacijom NADH ako se kao akceptor elektrona koristi kisik ili piruvat. Vrijednost $\Delta E_0'$ za par $1/2 \text{ O}_2 / \text{H}_2\text{O}$ iznosi 0,82 V, za par piruvat/laktat iznosi -0,19V, a za par NAD^+/NADH iznosi -0,32V. Napišite reakcije oksidacije NADH u ova dva slučaja.

Rješenje:

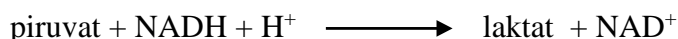
$$\Delta E_0' \text{ } 1/2 \text{ O}_2 / \text{H}_2\text{O} = 0,82 \text{ V}$$

$$\Delta E_0' \text{ piruvat/laktat} = -0,19 \text{ V}$$

$$\Delta E_0' \text{ NAD}^+/\text{NADH} = -0,32 \text{ V}$$

$$\Delta E_0' = E_0' (A_{\text{ox/red}}) - E_0' (B_{\text{ox/red}})$$

akceptor e⁻ donor e⁻



Redoks-potencijal para piruvat/laktat je pozitivniji od redoks-potencijala para NAD⁺/NADH pa će u standardnim uvjetima elektroni teći s NADH na piruvat tj. par NAD⁺/NADH će biti donor, a par piruvat/laktat akceptor elektrona.

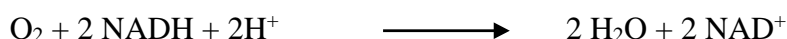
$$\Delta E_0' = -0,19 - (-0,32) = +0,13 \text{ V}$$

$$\Delta G^{0'} = -n F \Delta E_0'$$

$$\Delta G^{0'} = -2 \times 96,487 \frac{\text{kJ}}{\text{V mol}} \times 0,13 \text{ V}$$

$$\Delta G^{0'} = -25,09 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

Redoks potencijal para ¹/₂ O₂ / H₂O je pozitivniji od redoks potencijala para NAD⁺/NADH pa će u standardnim uvjetima elektroni teći s NADH na kisik tj. par NAD⁺/NADH će biti donor, a par ¹/₂O₂/H₂O akceptor elektrona.



$$\Delta E_0' = 0,82 - (-0,32) = +1,14 \text{ V}$$

$$\Delta G^{0'} = -n F \Delta E_0'$$

$$\Delta G^{0'} = -2 \times 96,487 \frac{\text{kJ}}{\text{V mol}} \times 1,14 \text{ V}$$

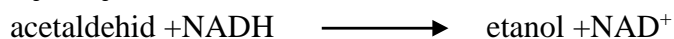
$$\Delta G^{0'} = -219,99 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

Više energije se oslobodi ako se kao akceptor elektrona korist kisik.

3. primjer

Izračunajte standardnu promjenu redoks-potencijala ΔE₀' para NAD⁺/NADH ako je ΔE₀' para acetaldehid/etanol -0,2 V, a vrijednost ΔG⁰ za reakciju koja se odvija u smjeru redukcije acetaldehida u etanol -23,15 kJ/mol.

Rješenje:



$$\Delta G^{0'} = -n F \Delta E_0'$$

$$\Delta E_0' = \frac{\Delta G^{0'}}{-nF}$$

$$\Delta E_0' = \frac{-23,15 \text{ kJ/mol}}{-2 \times 96,487 \text{ kJ/mol}}$$

$$\Delta E_0' = 0,12 \text{ V}$$

Elektroni se u ovoj reakciji prenose s NADH na acetaldehid pa je par acetaldehid/etanol akceptor, a par NAD^+/NADH donor elektrona.

$$\Delta E_0' = \Delta E_0' \text{ acetaldehid/etanol} - \Delta E_0' \text{ NAD}^+/\text{NADH}$$

$$0,12 \text{ V} = -0,2 - \Delta E_0' \text{ NAD}^+/\text{NADH}$$

$$\Delta E_0' \text{ NAD}^+/\text{NADH} = -0,2 - 0,12$$

$$\Delta E_0' \text{ NAD}^+/\text{NADH} = -0,32 \text{ V}$$

Zadatci za vježbu - redoks-potencijal i promjena slobodne energije

1. Izračunajte oslobađa li se više energije oksidacijom FADH_2 ako se kao akceptor elektrona koristi kisik ili fumarat. Vrijednost E_0' za par $1/2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ iznosi 0,82 V, za par fumarat/sukcinat 0,03V, a za par FAD/FADH_2 -0,22V.
2. Izračunajte oslobađa li se više energije oksidacijom NADH ako je akceptor elektrona acetaldehid ili α -ketoglutarat. Vrijednost E_0' za par acetaldehid /etanol iznosi -0,2 V, za par α -ketoglutarat / sukcinat+ CO_2 -0,67 V, a za par NAD^+/NADH -0,32V.
3. Izračunajte kolika bi bila promjena standardne slobodne energije ΔG^0 i konstanta ravnoteže K' za redukciju NAD^+ u reakciji sa etanolom. Standardni redoks-potencijal $\Delta E_0'$ para $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ je -0,32 V, a para acetaldehid / etanol -0,2 V.
4. Izračunajte promjenu standardne slobodne energije, ΔG^0 , za reakciju koju katalizira malatni enzim ako ona teče u smjeru redukcije piruvata. $\Delta E_0'$ oksidativne dekarboksilacije malata je -0,2 V, a redukcije NADP^+ -0,32 V.
5. Izračunajte konstantu ravnoteže reakcije oksidacije etanola ako je $\Delta E_0'$ para acetaldehid / etanol jednaka -0,2 V, a $\Delta E_0'$ para NAD^+/NADH -0,32V.
6. ΔG^0 reakcije koju katalizira laktat dehidrogenaza u smjeru redukcije piruvata, iznosi -25,1 kJ/mol. Izračunajte koliki je standardni redoks-potencijal redukcije NAD^+ , ako standardni redoks-potencijal $\Delta E_0'$ para piruvat / laktat iznosi -0,19 V.
7. Izračunajte koliko se elektrona treba prenijeti sa sustava s redoks-potencijalom $E_0' = +0,31\text{V}$ na sustav s $E_0' = +0,43\text{V}$ da bi se dobilo dovoljno energije za sintezu 6 molova ATP-a? (ΔG^0 hidrolize ATP = -30,5 kJ/mol).
8. Izračunajte standardnu promjenu redoks-potencijala $\Delta E_0'$ para $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ ako je $\Delta E_0'$ para piruvat / laktat -0,19 V, a vrijednost ΔG^0 za reakciju oksidacije laktata 25,1 kJ/mol. Izračunajte kolika je konstanta ravnoteže reakcije oksidacije laktata.
9. Izračunajte koliko se elektrona treba prenijeti sa sustava s redoks-potencijalom $E_0' = +0,31\text{V}$ na sustav s $E_0' = +0,43\text{V}$ da bi se dobilo dovoljno energije za sintezu 5 molova ATP-a? (ΔG^0 hidrolize ATP = -30,5 kJ/mol).

7. OKSIDACIJSKA FOSFORILACIJA

Proces oksidacijske fosforilacije (respiracijski lanac, dišni lanac) povezuje proces oksidacije reduciranih koenzima i sintezu ATP-a, pri čemu se ATP sintetizira fosforilacijom ADP-a sa P_i . Reducirani koenzimi nastaju u kataboličkim procesima gdje se u reakcijama oksidacije različitih supstrata oslobađa velika količina energije koja se pohranjuje u formi reduciranih koenzima. Reducirani koenzimi zatim prenose elektrone koje su primili tijekom oksidacije supstrata na krajnji akceptor elektrona kisik putem niza nosača elektrona smještenih u unutarnjoj membrani mitohondrija u tzv. respiracijskim nakupinama. Respiracijske nakupine su veliki proteinski kompleksi uronjeni u unutrašnju membranu mitohondrija. Proteini u tim kompleksima sadrže prostetske grupe koje mogu primati i otpuštati elektrone (reducirati se i oksidirati). Prva respiracijska nakupina je *NADH-Q-oksido-reduktaza (kompleks I)* koja prima elektrone sa NADH i nizom naizmjeničnih redukcija i oksidacija svojih prostetskih grupa ih prenosi na pokretni nosač *koenzim Q*. Reducirani *koenzim Q* zatim difundira kroz membranu do kompleksa *Q-citokrom c-oksido-reduktaze (kompleks III)* na koji predaje elektrone, a time se sam oksidira. $FADH_2$ se oksidira predajući elektrone na kompleks *sukcinat-Q-reduktaze (kompleks II)*. Elektrone sa *sukcinat-Q-reduktaze* također preuzima *koenzim Q* i prenosi na kompleks *Q-citokrom c-oksido-reduktaze (kompleks III)*. NADH i $FADH_2$ se ne mogu oksidirati na istoj respiracijskoj nakupini jer je potencijal NADH za prijenos elektrona veći od potencijala $FADH_2$. Stoga elektrone sa $FADH_2$ prima *kompleks II* koji ima veći afinitet za elektrone nego *kompleks I*. Elektroni se dalje sa *kompleksa III* prenose na kompleks *citokrom c-oksidaze (kompleks IV)* pomoću topivog nosača *citokroma c*. *Citokrom c* je mala hidrofilna proteinska molekula i nalazi se otopljena u međumembranskom prostoru uz vanjsku stranu unutrašnje membrane mitohondrija. Tok elektrona kroz respiracijske nakupine dovodi do pumpanja protona iz matriksa u međumembranski prostor mitohondrija, pa nastaje gradijent koncentracije protona. Pri tome je koncentracija protona visoka u međumembranskom prostoru (niži pH), a niska u matriksu mitohondrija (viši pH). Vraćanjem protona u matriks mitohondrija se oslobađa energija koja se koristi za sintezu ATP-a.

Prilikom toka elektrona niz respiracijski lanac (sa NADH i $FADH_2$ na O_2) tri respiracijska kompleksa djeluju kao pumpe protona: *NADH-Q-oksido-reduktaza, Q-citokrom c-reduktaza i citokrom c-oksidaza*. Kompleks *sukcinat-Q-reduktaze* ne djeluje kao pumpa protona. Prilikom prijenosa $2e^-$ sa NADH na *NADH-Q-oksido-reduktazu* ovaj kompleks pumpa $4H^+$ u međumembranski prostor. Kompleks *Q-citokrom c-reduktaze* u međumembranski

prostor pumpa 2H^+ , a *citokrom c-oksidaža* u međumembranski prostor pumpa 4H^+ po paru elektrona. Ukupno se na račun energije oslobođene oksidacijom NADH u međumembranski prostor ispumpa 10H^+ , a oksidacijom FADH_2 6H^+ .

Protoni se u matriks mitohondrija vraćaju kroz kompleks *ATP-sintaze*. *ATP-sintaza* je transmembranski proteinski kompleks koji se sastoji od dvije komponente – F_0 i F_1 . Protoni se u matriks mitohondrija vraćaju kroz F_0 komponentu kompleksa *ATP-sintaze*, a F_1 komponenta *ATP-sintaze* sadrži katalitičke podjedinice koje provode sintezu ATP-a iz ADP i P_i . Kroz protonski kanal F_0 komponente mora proći 10 protona iz međumembranskog prostora nazad u matriks mitohondrija da bi F_1 podjedinica sintetizirala 3 molekule ATP-a. Iz toga se može aproksimirati da je za sintezu 1 ATP-a potreban povratak otprilike 3 protona u matriks mitohondrija. Međutim, da bi došlo do sinteze ATP-a potrebno je iz citosola u matriks mitohondrija transportirati ADP i fosfatnu grupu. Fosfatna grupa (H_2PO_4^-) se unosi u matriks specifičnim proteinskim nosačem koji uz fosfatnu grupu istovremeno u matriks unosi i jedan proton kako bi se održala ionska ravnoteža. Stoga je za sintezu 1 ATP ukupno potrebno vratiti u matriks mitohondrija 4 protona (3 kroz *ATP-sintazu* i 1 za unos fosfatne grupe). To znači da se oksidacijom NADH, pri kojoj se u međumembranski prostor ispumpa 10 protona, dobije dovoljno energije za sintezu 2,5 ATP-a (ukupno 10 izbačenih protona / 4 vraćena u matriks za 1 ATP = 2,5). S druge strane, na račun energije oslobođene oksidacijom FADH_2 se u međumembranski prostor ispumpa samo 6H^+ , pa se oksidacijom FADH_2 dobije dovoljno energije za sintezu samo 1,5 ATP-a (ukupno 6 izbačenih protona / 4 vraćena u matriks za 1 ATP = 1,5).

Citosolni NADH se ne može direktno oksidirati u procesu oksidacijske fosforilacije jer nema transportnih proteina koji bi omogućili prijenos NADH iz citosola u mitohondrij. Stoga se oksidacija citosolnog NADH povezuje sa oksidacijskom fosforilacijom putem enzimskih sustava koji omogućuju transport elektrona sa citosolnog NADH u respiracijski lanac. Najčešće korišten sustav je tzv. "*glicerol-fosfatni povratni prijenosnik*" u koji su uključena dva enzima – citosolna *glicerol-3-fosfat dehidrogenaza* i mitohondrijska *glicerol-3-fosfat dehidrogenaza*. Citosolna *glicerol-3-fosfat dehidrogenaza* oksidira citosolni NADH pri čemu se dihidroxiacetonfosfat reducira u glicerol-3-fosfat. Glicerol-3-fosfat zatim difundira kroz vanjsku mitohondrijsku membranu u međumembranski prostor mitohondrija gdje se ponovno oksidira u reakciji koju katalizira mitohondrijska *glicerol-3-fosfat dehidrogenaza*. Mitohondrijska *glicerol-3-fosfat dehidrogenaza* je vezana na unutarnju mitohondrijsku membranu, pri čemu joj je aktivno mjesto okrenuto prema međumembranskom prostoru, a kao koenzim koristi FAD. Oksidacijom glicerol-3-fosfata u ovoj reakciji nastaje ponovno

dihidroksiacetonfosfat, koji difundira natrag u citosol, dok elektrone prima FAD. Reducirani FADH₂ predaje primljene elektrone na *koenzim Q* u unutarnjoj mitohondrijskoj membrani, koji ih zatim prenosi dalje u respiracijski lanac i predaje na kompleks *Q-citokrom c-oksido reduktaze*. Na ovaj način su elektroni preuzeti oksidacijom citosolnog NADH preneseni na mitohondrijski FAD. Oksidacijom FADH₂ u respiracijskom se lancu oslobodi dovoljno energije za sintezu 1,5 ATP-a, budući da se tokom elektrona kroz komplekse *Q-citokrom c-oksido reduktaze* i *citokrom-c oksidaze* u međumembranski prostor izbaci samo 6 protona. Stoga se oksidacijom citosolnog NADH dobije 1 ATP manje nego oksidacijom mitohondrijskog NADH.

Za shematski prikaz oksidacijske fosforilacije i glicerol-fosfatnog povratnog prijenosnika upućuje se pogledati J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 502-530.

Primjeri zadataka – oksidacijska fosforilacija

1. primjer

Izračunajte koliko bi se molekula ATP-a moglo sintetizirati u procesu oksidacijske fosforilacije na račun energije dobivene oksidacijom reduciranih koenzima dobivenih potpunom razgradnjom 4 molekule acetil-CoA u citratnom ciklusu.

Rješenje:

Oksidacijom jedne molekule acetil-CoA u citratnom ciklusu dobije se 3 molekule NADH i jedna molekula FADH₂, pa bi se oksidacijom 4 molekule acetil-CoA dobilo 12 molekula NADH i 4 molekule FADH₂. Oksidacijom svake molekule NADH ispumpa se u međumembranski prostor mitohondrija 10 H⁺ iona, a oksidacijom svake molekule FADH₂ ispumpa se u međumembranski prostor mitohondrija 6 H⁺ iona.

$$12 \times 10 + 4 \times 6 = 144$$

Ukupno se u međumembranski prostor mitohondrija ispumpa 144 H⁺ iona. Za sintezu jednog ATP-a potrebno je u matriks mitohondrija vratiti 4 H⁺ iona.

$$\frac{144}{4} = 36$$

Na račun energije oslobođene oksidacijom ovih koenzima može se sintetizirati 36 molekula ATP-a.

2. primjer

Koliko će se molekula ATP-a dobiti na račun energije oksidacije 10 molekula citosolnog NADH, 10 molekula mitohondrijskog FADH₂ i 30 molekula mitohondrijskog NADH dobivenih kataboličkim reakcijama u stanicama u kojima je inaktivna NADH-Q-oksidoireduktaza.

Rješenje:

Ako je u stanicama inaktivna NADH-Q-oksidoireduktaza neće se moći oksidirati mitohondrijski NADH koji svoje elektrone treba predati na taj kompleks. Citosolni NADH s druge strane svoje elektrone šalje putem glicerol-fosfatnog povratnog prijenosnika pa će se na račun njegove oksidacije, kao i oksidacije FADH₂ za svaku oksidiranu molekulu ispumpati po 6 H⁺ iona u međumembranski prostor.

| reducirani koenzim | broj ispumpanih H ⁺ | broj ATP-a |
|--------------------------|--------------------------------|------------|
| 10 NADH (citosolni) | 60 | 15 |
| 10 FADH ₂ | 60 | 15 |
| 30 NADH (mitohondrijski) | 0 | 0 |
| ukupno: | Σ 120 | Σ 30 ATP |

Sintetizirat će se ukupno 30 ATP-a jer se mitohondrijski NADH neće moći oksidirati zbog inaktivnog kompleksa NADH-Q-oksidoireduktaze.

3. primjer

Koliko će se molekula ATP-a dobiti na račun energije oksidacije 10 molekula citosolnog NADH, 10 molekula mitohondrijskog FADH₂ i 30 molekula mitohondrijskog NADH dobivenih kataboličkim reakcijama u stanicama u kojima je inaktivna sukcinat-Q-reduktaza.

Rješenje:

U ovim stanicama se neće moći oksidirati FADH₂ molekule jer je inaktivan kompleks koji prima njihove elektrone.

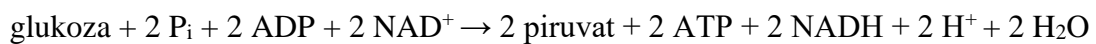
| reducirani koenzim | broj ispumpanih H ⁺ | broj ATP-a |
|--------------------------|--------------------------------|------------|
| 10 NADH (citosolni) | 0 | 0 |
| 10 FADH ₂ | 0 | 0 |
| 30 NADH (mitohondrijski) | 300 | 75 |
| ukupno: | Σ 300 | Σ 75 ATP |

Sintetizirat će se ukupno 75 ATP-a jer se citosolni NADH (koji predaje elektrone na mitohondrijski FADH₂) i mitohondrijski FADH₂ neće moći oksidirati zbog inaktivnog kompleksa sukcinat-Q-reduktaze.

8. GLIKOLIZA

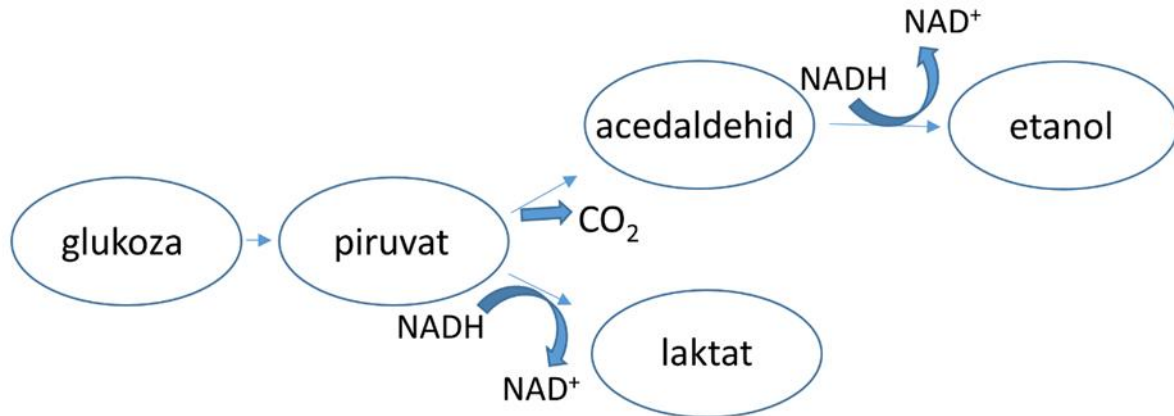
Glikoliza je metabolički put kojim se molekula glukoze prevodi u dvije molekule piruvata. Osnovna svrha razgradnje glukoze u procesu glikolize je dobivanje energije za sintezu ATP-a. Druga uloga procesa glikolize u metabolizmu stanice je sinteza prekursora za biosintetske reakcije (sintezu masnih kiselina i aminokiselina). Glikoliza se odvija u citosolu, u aerobnim i anaerobnim uvjetima, a brzina odvijanja procesa ovisi o potrebama stanice za energijom, koncentraciji biosintetskih prekursora i koncentraciji glukoze.

Glikoliza počinje fosforilacijom i izomerizacijom glukoze u fruktoza-1,6-bisfosfat koji se zatim cijepa na dvije trioze koje se daljnjim nizom reakcija prevode u dva piruvata. Sumarna jednažba procesa glikolize glasi:



Osim glukoze u proces glikolize se odgovarajućim reakcijama mogu uključiti i drugi šećeri heksoze kao što su fruktoza, galaktoza i manoza. Glikoliza može teći sve dok ima oksidiranog oblika koenzima NAD^+ u citosolu. Međutim, količina NAD^+ u stanici je ograničena, pa se ovaj koenzim mora kontinuirano regenerirati. U aerobnim uvjetima se oksidacija reduciranih koenzima odvija u procesu oksidacijske fosforilacije pri čemu je krajnji akceptor elektrona O_2 . Citosolni NADH ne može proći kroz membranu mitohondrija da bi se direktno oksidirao u oksidacijskoj fosforilaciji nego svoje elektrone u proces oksidacijske fosforilacije šalje posredno tzv. glicerol-fosfatnim povratnim prijenosnikom (vidi J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 527-528). U anaerobnim uvjetima proces oksidacijske fosforilacije ne može teći zbog nedostatka kisika kao krajnjeg akceptora elektrona, pa se NADH oksidira u reakcijama fermentacije pri čemu iz piruvata, kao krajnjeg produkta glikolize, nastaju etanol ili laktat (ovisno o tipu stanice). U stanicama kvasca i nekih mikroorganizama se oksidacija NADH u anaerobnim uvjetima odvija tako da se prvo molekula piruvata dekarboksilira u acetaldehid, a zatim reducira u etanol pri čemu se NADH oksidira u NAD^+ (Slika 7). Reakciju dekarboksilacije piruvata katalizira enzim ***piruvat dekarboksilaza*** uz tiaminpirofosfat (TPP) kao prostetsku skupinu. Ova reakcija je ireverzibilna. Reakciju redukcije acetaldehida u etanol katalizira enzim ***alkohol dehidrogenaza***. U stanicama bakterija mliječne kiseline i u animalnom mišićnom tkivu u anaerobnim uvjetima se piruvat reducira u laktat uz oksidaciju NADH u NAD^+ . Reakciju redukcije piruvata u laktat katalizira

enzim *laktat dehidrogenaza*. Ova reakcija je reverzibilna, pa smjer njenog odvijanja (oksidacija laktata ili redukcija piruvata) ovisi o omjeru koncentracija NADH / NAD⁺ (Slika 7).



Slika 7. Prikaz oksidacije citosolnog NADH reakcijama koje kataliziraju *alkohol dehidrogenaza* i *laktat dehidrogenaza*

Budući da je uloga glikolize u metabolizmu stanice dvostruka (dobivanje energije za sintezu ATP-a i sinteza prekursora za biosintetske reakcije), brzina glikolize se mora regulirati tako da omogući ispunjavanje objiju uloga te da bude u skladu s raspoloživom količinom glukoze. Brzina glikolize se regulira preko alosteričkih enzima *heksokinaze*, *fosfofruktokinaze* i *piruvat kinaze* koji kataliziraju praktički ireverzibilne reakcije glikolize. Aktivnost *heksokinaze* se regulira alosteričkom inhibicijom glukoza-6-fosfatom (inhibicija produktom). *Fosfofruktokinaza* se inhibira visokom koncentracijom ATP-a i citrata, a aktivira visokom koncentracijom AMP-a i fruktoza-2,6-bisfosfatom. Fruktoza-2,6-bisfosfat se sintetizira djelovanjem tandem enzima *fosfofruktokinaze 2* pri visokoj koncentraciji glukoze. *Piruvat kinaza* se alosterički inhibira povišenom koncentracijom ATP-a i alanina, a alosterički aktivira povišenom koncentracijom fruktoza-1,6-bisfosfata. U nekim tkivima se aktivnost *piruvat kinaze* regulira i reverzibilnom kovalentnom preinakom fosforilacijom / defosforilacijom, ovisno o koncentraciji raspoložive glukoze. Pri niskoj koncentraciji glukoze aktivira se *protein kinaza A* koja fosforilira i time inhibira aktivnost *piruvat kinaze*. Pri visokoj koncentraciji glukoze aktivira se *protein fosfataza* koja defosforilacijom ponovno aktivira *piruvat kinazu*. (za shematski prikaz puta glikolize vidi: J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 436.).

Primjeri zadataka – glikoliza

1. primjer

Navedite sve efektore koji reguliraju brzinu glikolize, na koje enzime i kojim mehanizmom (vrstom) regulacije djeluju te kakve su posljedice njihovog djelovanja na brzinu odvijanja glikolize.

Rješenje:

- ATP – djeluje kao alosterički inhibitor fosfofruktokinaze i piruvat kinaze – usporava glikolizu
- Glukoza-6-fosfat – djeluje kao alosterički inhibitor heksokinaze – usporava glikolizu
- Citrat – djeluje kao alosterički inhibitor fosfofruktokinaze – usporava glikolizu
- Alanin – djeluje kao alosterički inhibitor piruvat kinaze – usporava glikolizu
- AMP – djeluje kao alosterički aktivator fosfofruktokinaze – ubrzava glikolizu
- Fruktosa-2,6-bisfosfat – djeluje kao alosterički aktivator fosfofruktokinaze – ubrzava glikolizu
- Fruktosa-1,6-bisfosfat – djeluje kao alosterički aktivator piruvat kinaze – ubrzava glikolizu

2. primjer

Napišite energetske bilancu iskorištenja glukoze kao izvora ugljika u anaerobnim uvjetima u stanicama bakterija mliječne kiseline.

Rješenje:

Reakcije u kojima se dobiva ili troši energija ATP-a ili ekvivalenta ATP-a su sljedeće:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--------------------------------------|---------------------|-------------------|
| heksokinaza | | -1 ATP |
| fosfofruktokinaza | | -1 ATP |
| gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza | + 2NADH | = + 3 ATP |
| fosfoglicerat kinaza | | +1 ATP |
| piruvat kinaza | | +1 ATP |
| laktat dehidrogenaza | - 2NADH | = -3 ATP |
| | | Σ +2ATP |

Sumarno se u ovom nizu reakcija dobiju 2 ekvivalenta ATP-a. NADH koji se dobije u reakciji koju katalizira gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza se regenerira u reakciji koju katalizira laktat dehidrogenaza.

3. primjer

Napišite niz reakcija kojima se fruktoza uključuje u glikolizu u stanicama jetre kada je u stanicama visoka koncentracija glukoze.

Rješenje:

| reakcija | enzim |
|---|----------------------------|
| Fruktoza+ATP \longrightarrow Fruktoza-1-fosfat+ADP | fruktokinaza |
| Fruktoza-1-fosfat \longrightarrow gliceraldehid+dihidroxiacetonfosfat | fruktoza-1-fosfat aldolaza |
| Gliceraldehid + ATP \longrightarrow gliceraldehid-3-fosfat + ADP | trioza kinaza |

Zadatci za vježbu – glikoliza

1. Navedite koje su od sljedećih tvrdnji o fosfofruktokinazi 2 točne, a koje netočne, te objasnite netočne tvrdnje:
 - a) ima protein fosfataznu aktivnost,
 - b) supstrat je protein kinaze A,
 - c) kod visoke koncentracije glukoze kao supstrat koristi se fruktoza-2,6-bisfosfat,
 - d) inhibira se alosterički s ATP-om i citratom,
 - e) katalizira reakciju fosforilacije na razini supstrata,
 - f) ima dvije domene čija se aktivnost recipročno regulira.
2. Navedite koje su od sljedećih tvrdnji o fosfofruktokinazi 2 točne, a koje netočne, te objasnite netočne tvrdnje:
 - a) kod visoke koncentracije glukoze kao supstrat koristi se fruktoza-6-fosfat,
 - b) supstrat je protein fosfataze,
 - c) ima protein kinaznu aktivnost,
 - d) podliježe alosteričkoj regulaciji,
 - e) katalizira reakciju fosforolize,
 - f) ima dvije podjedinice čija se aktivnost recipročno regulira.
3. Napišite strukturnim formulama sve reakcije glikolize u kojima dolazi do fosforilacije na razini supstrata.
4. Napišite strukturnim formulama sve reakcije preko kojih se regulira brzina glikolize.
5. Koliko će se molekula ATP-a dobiti (direktno ili indirektno) razgradnjom jedne molekule glukoze do 2-fosfoglicerata?
6. Napišite reakcije glikolize koje kataliziraju enzimi čija se aktivnost alosterički regulira.
7. Napišite strukturnim formulama zbirnu jednadžbu razgradnje fruktoze u stanicama kvasca u anaerobnim uvjetima.
8. Napišite niz reakcija kojima se u glikolizu uključuje galaktoza.
9. Napišite strukturnim formulama reakcije glikolize u kojima se dobiva energija u obliku ATP-a ili ekvivalenta ATP-a.
10. Izračunajte koliko bi razgradnjom 3,4 g saharoze do piruvata dobili:
 - a) grama piruvata,
 - b) molova ATP-a (direktno, ne ubrajajući ekvivalente ATP-a),
 - c) energije (izraženo u kJ).

$$M_{\text{saharoze}} = 342,3 \text{ g/mol}; M_{\text{piruvata}} = 87 \text{ g/mol}; \Delta G^0 \text{ hidrolize ATP-a} = -30,5 \text{ kJ/mol}$$

11. Navedite hoće li se i kako na aktivnost enzima koji sudjeluju u procesu glikolize odraziti povećanje:

- a) koncentracije fruktoza-1,6-bisfosfata,
- b) omjera koncentracija ATP/ADP,
- c) koncentracije alanina,
- d) omjera koncentracija NADPH/NADP⁺,
- e) omjera koncentracija NADH/NAD⁺,
- f) koncentracije acetil-CoA,
- g) koncentracije fruktoza-6-fosfata.

12. Napišite strukturnim formulama sve reakcije glikolize u kojima dolazi do izomerizacije.

13. Izračunajte koliko će mL CO₂, a koliko mL etanola proizvesti kvasac u tijestu (anaerobni uvjeti) iz 5 g maltoze uz iskorištenje glikolize od 45 % ($M_{r_{\text{maltoze}}} = 342,3$; $M_{r_{\text{CO}_2}} = 44$; $M_{r_{\text{EtOH}}} = 46$; $\rho_{\text{EtOH}} = 789 \text{ g/L}$).

9. KOMPLEKS PIRUVAT DEHIDROGENAZE

Piruvat se u aerobnim uvjetima unosi u mitohondrije te se oksidira i dekarboksilira u acetilnu jedinicu koja se veže na CoA. Ovu reakciju katalizira **kompleks piruvat dehidrogenaze**. Reakcija je ireverzibilna i povezuje glikolizu s citratnim ciklusom. **Kompleks piruvat dehidrogenaze** je građen od 3 vrste enzima koji kataliziraju pojedine stupnjeve ove složene reakcije. Prva enzimska komponenta ovog kompleksa je **piruvat dehidrogenaza** (E₁), druga **dihidrolipoil transacetilaza** (E₂), a treća **dihidrolipoil dehidrogenaza** (E₃). **Piruvat dehidrogenaza** (E₁) ima prostetsku skupinu tiaminpirofosfat (TPP), **dihidrolipoil transacetilaza** (E₂) ima prostetsku skupinu lipoamid, a **dihidrolipoil dehidrogenaza** (E₃) prostetsku skupinu FAD. U reakciji sudjeluju još dva koenzima – CoA i NAD⁺. Aktivnost ovog kompleksa je inhibirana pri visokim koncentracijama ATP-a, GTP-a, NADH i acetil-CoA.

Zbirna jednadžba reakcije kompleksa piruvat dehidrogenaze:



Za detaljniji prikaz reakcija kataliziranih kompleksom piruvat dehidrogenaze upućuje se pogledati J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 478 – 481.

Primjeri zadataka – kompleks piruvat dehidrogenaze

1. primjer

Prikažite zbirnu jednadžbu i kemijski definirajte sve stupnjeve enzimske reakcije koju katalizira oligoenzimski kompleks piruvat-dehidrogenaze.

Rješenje:

Zbirna jednadžba:



Kemijska definicija: Prva dva koraka katalizira piruvat dehidrogenazna komponenta kompleksa (E₁), pri čemu u prvom koraku dolazi do dekarboksilacije piruvata u hidroksietil, a u drugom do oksidacije hidroksietila u acetil uz redukciju lipoamida i vezanje acetilne jedinice

na lipoamid. Treći korak katalizira dihidrolipoil transacetilaza (E2), pri čemu dolazi do transfera acetilne jedinice sa acetillipoamida na CoA.

Zadnja dva koraka katalizira dihidrolipoil dehidrogenaza (E3), pri čemu u četvrtom koraku dolazi do oksidacije dihidrolipoamida u lipoamid uz redukciju FAD u FADH₂. U posljednjem koraku dolazi do oksidacije FADH₂ u FAD uz redukciju NAD⁺ u NADH.

2. primjer

Definirajte funkcije svih kofaktora kompleksa piruvat dehidrogenaze u enzimskim reakcijama koje katalizira ovaj kompleks.

Rješenje:

- Piruvat dehidrogenazna komponenta kompleksa (E1): prostetska skupina je tiaminpirofosfat (TPP).

Piruvat se veže na TPP te se dekarboksilira dajući hidroksietil-TPP.

TPP - veže hidroksietilnu skupinu prilikom dekarboksilacije piruvata.

- Dihidrolipoil transacetilaza (E2): prostetska skupina je lipoamid, a koenzim CoA. Oksidans je disulfidna skupina lipoamida koja u reakciji prelazi u sulfhidrilni oblik. Hidroksietilna skupina se oksidira i prenosi na lipoamid te tako nastaje acetillipoamid. Acetilna jedinica se prenosi sa acetillipoamida na CoA.

Lipoamid – oksidira hidroksietil u acetil i prenosi ga na koenzim A.

Koenzim A (CoA) – prenosi aktiviranu acetilnu grupu.

- Dihidrolipoil dehidrogenaza (E3): prostetska skupina je FAD, a koenzim NAD⁺. FAD – oksidira dihidrolipoamid u lipoamid pri čemu se sam reducira. NAD⁺ – oksidira FADH₂ u FAD pri čemu se sam reducira u NADH.

3. primjer

Napišite reakciju piruvat dehidrogenaze i navedite kojim mehanizmom regulacije i na koji način (pozitivno ili negativno) će biti regulirana njena aktivnost kod visokog omjera koncentracije NADH / NAD⁺ u stanicama.

Rješenje:



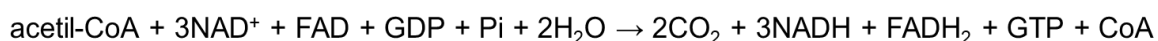
NADH alosterički inhibira dihidrolipoil dehidrogenaznu (E3) komponentu kompleksa piruvat dehidrogenaze. Visok omjer NADH/NAD⁺ alosterički aktivira **kinazu piruvat dehidrogenaze**. Alosterički aktivirana kinaza piruvat dehidrogenaze potom fosforilira piruvat dehidrogenaznu komponentu (E1) kompleksa i na taj način dovodi do inaktivacije piruvat dehidrogenaze.

10. CIKLUS LIMUNSKKE KISELINE

Ciklus limunske kiseline (citratni ciklus, Krebsov ciklus) je zajednički završni put oksidacije molekula dobivenih razgradnjom ugljikohidrata, masnih kiselina i aminokiselina. Većina molekula ulazi u ciklus u obliku acetil-CoA. Citratni ciklus se odvija u matriksu mitohondrija isključivo u aerobnim uvjetima. Osnovna uloga mu je dobivanje energije oksidacijom molekula supstrata. Međutim, ovaj ciklus je i važan izvor prekursora za sintezu aminokiselina, nukleotidnih baza i porfirina.

Citratni ciklus čini osam povezanih reakcija kojima se acetilna jedinica oksidira do 2 CO₂, a energija oslobođena oksidacijom akumulira se u obliku reduciranih koenzima FADH₂ i NADH. Dobiveni reducirani koenzimi se nakon toga oksidiraju u procesu oksidacijske fosforilacije, a energija oslobođena njihovom oksidacijom koristi se za sintezu ATP-a.

Zbirna jednadžba citratnog ciklusa:



Brzina citratnog ciklusa se regulira preko tri enzima: *citrat sintaze*, *izocitrat dehidrogenaze* i *α-ketoglutarat dehidrogenaze*. Aktivnost *citrat sintaze* regulira se u prokariotskim stanicama alosteričkom inhibicijom visokom koncentracijom ATP-a. U stanicama eukariota su ključna mjesta regulacije alosterički enzimi *izocitrat dehidrogenaza* i *α-ketoglutarat dehidrogenaza*. *Izocitrat dehidrogenazu* alosterički aktivira ADP, a inhibira NADH i ATP. *α-ketoglutarat dehidrogenazu* inhibiraju produkti reakcije sukcinil-CoA i NADH, te visoka koncentracija ATP-a.

Za shematski prikaz reakcija citratnog ciklusa upućuje se pogledati J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 489.

Primjeri zadataka – ciklus limunske kiseline

1. primjer

Koliko će se molekula ATP dobiti (direktno ili indirektno) razgradnjom jedne molekule glukoze do malata (uz korištenje glicerol-fosfatnog povratnog prijenosnika)?

Rješenje:

Energija se troši ili dobiva u sljedećim reakcijama:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|---------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| heksokinaza | | -1 ATP |
| fosfofruktokinaza | | -1 ATP |
| gliceraldehid -3-fosfat dehidrogenaza | +2 NADH | = +3 ATP |
| fosfoglicerat kinaza | | +2 ATP |
| piruvat kinaza | | +2 ATP |
| piruvat dehidrogenaza | +2 NADH | = +5 ATP |
| izocitrat dehidrogenaza | +2 NADH | = +5 ATP |
| α -ketoglutarat dehidrogenaza | +2 NADH | = +5 ATP |
| sukcetil-CoA-sintetaza | +2 GTP | = +2 ATP |
| sukcinat dehidrogenaza | +2 FADH ₂ | = +3 ATP |
| | | Σ +25ATP |

Ukupno se ovim nizom reakcija dobije 25 ekvivalenata ATP-a.

2. primjer

Koliki se volumen CO₂ oslobodi u citratnom ciklusu ako u njega uđe acetil-CoA nastao iz 1g saharoze? ($M_{\text{saharoze}} = 342,29 \text{ g/mol}$)

Rješenje:

Najprije treba izračunati koliko ima molova saharoze u 1 g saharoze:

$$n(\text{saharoze}) = \frac{1 \text{ g}}{342,29 \text{ g/mol}} = 2,92 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

Iz svakog mola saharoze dobiju se dva mola heksoza:

$$n(\text{glukoze/fruktoze}) = 2 \times n(\text{saharoze}) = 2 \times 2,92 \times 10^{-3} \text{ mol} = 5,84 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

Iz svakog mola heksoze dobiju se dva mola piruvata u glikolizi:

$$n(\text{piruvat}) = 2 \times n(\text{glukoze/fruktoze}) = 2 \times 5,84 \times 10^{-3} \text{ mol} = 0,012 \text{ mol}$$

Iz svakog mola piruvata dobije se jedan mol acetil-CoA:

$$n(\text{piruvat}) = n(\text{acetil-CoA})$$

Iz svakog mola acetil-CoA u citratnom ciklusu se oslobode 2 mola CO₂

$$n(\text{CO}_2) = 2 \times n(\text{acetil-CoA}) = 2 \times 0,012 \text{ mol} = 0,024 \text{ mol}$$

Iz broja molova CO₂ i molarnog volumena plina (22,414 L/mol) možemo izračunati konačni volumen oslobođenog CO₂:

$$V(\text{CO}_2) = 22,414 \frac{\text{L}}{\text{mol}} \times 0,024 \text{ mol} = 0,538 \text{ L}$$

$$V(\text{CO}_2) = 538 \text{ mL}$$

3. primjer

Napišite zbirnu reakciju za ciklus limunske kiseline koji se odvija u stanicama kvasca kod kojih je inaktivirana sukcinat dehidrogenaza.

Rješenje:

Niz reakcija koje se odvijaju je sljedeći:

| Reakcija | Enzim |
|---|------------------------------|
| acetyl-CoA + oksaloacetat + H ₂ O → citrat + CoA | citrat sintaza |
| citrat → izocitrat | akonitaza |
| izocitrat + NAD ⁺ → α-ketoglutarat + CO ₂ + NADH | izocitrat dehidrogenaza |
| α-ketoglutarat + CoA + NAD ⁺ → sukcinil-CoA + CO ₂ + NADH | α-ketoglutarat dehidrogenaza |
| sukcinil-CoA + Pi + GDP → sukcinat + GTP + CoA | sukcinil-CoA sintetaza |
| Zbirna jednačba: | |
| oksalacetat + acetyl-CoA + 2NAD ⁺ + GDP + Pi + H ₂ O → sukcinat + CoA + 2NADH + 2 CO ₂ + GTP | |

Zadatci za vježbu – ciklus limunske kiseline

1. Napišite zbirnu jednadžbu ciklusa limunske kiseline u stanicama kvasca.
2. Napišite zbirnu jednadžbu ciklusa limunske kiseline u stanicama kvasca kod kojih je inaktivirana malat dehidrogenaza.
3. Napišite zbirnu jednadžbu ciklusa limunske kiseline u stanicama kvasca kod kojih je inaktivirana fumaraza.
4. Napišite strukturnim formulama sve reakcije citratnog ciklusa u kojima dolazi do oksidacije supstrata.
5. Napišite zbirnu jednadžbu potpune razgradnje glukoze ako je u stanicama inaktivirana sukcinat dehidrogenaza.
6. Napišite strukturnim formulama reakcije citratnog ciklusa u kojima dolazi do oksidativne dekarboksilacije supstrata.
7. Napišite strukturnim formulama reakcije citratnog ciklusa u kojima nastaje tioesterska veza i kemijski definirajte te reakcije.
8. Napišite strukturnim formulama reakcije citratnog ciklusa u kojima dolazi do fosforilacije na razini supstrata.
9. Kemijski definirajte i napišite strukturnim formulama reakcije preko kojih se regulira brzina citratnog ciklusa.
10. Napišite zbirnu jednadžbu citratnog ciklusa ako je u stanici visoka koncentracija ATP-a i NADH.
11. Napišite zbirnu jednadžbu ciklusa limunske kiseline kada se odvija djelomično, tako da se dobije samo 50 % energije koja se dobije kada se ciklus odvija u potpunosti.
12. Napišite zbirnu jednadžbu ciklusa limunske kiseline kada se odvija djelomično, tako da se dobije samo 25 % energije koja se dobije kada se ciklus odvija u potpunosti.
13. Napišite koju vrstu kemijske reakcije katalizira α -ketoglutarat dehidrogenaza te navedite pripadajuće prostetske grupe i/ili koenzime za taj enzim.
14. Napišite reakcije preko kojih se regulira brzina citratnog ciklusa te navedite odgovarajuće faktore i mehanizme regulacije enzima koji ih kataliziraju.

15. Napišite zbirnu jednadžbu niza reakcija kojim biste iz 1,3-bisfosfoglicerata mogli dobiti sukcinat u animalnim stanicama u kojima je inaktivna izocitrat dehidrogenaza, u uvjetima kada stanica ima dovoljno energije, te izračunajte koliko će se energije (izraženo brojem molekula ATP-a) dobiti ili potrošiti u tom nizu reakcija uz korištenje glicerol-fosfatnog povratnog prijenosnika.

11. GLUKONEOGENEZA

Glukoneogeneza je anabolički proces kojim se iz neugljikohidratnih preteča sintetizira glukoza. Unatoč tome što glukoneogeneza i glikoliza dijele veliki broj reakcija, glukoneogeneza nije jednostavan obrat glikolize već su ireverzibilne reakcije glikolize u glukoneogenezi zamijenjene novim reakcijama kako bi odvijanje glukoneogeneze bilo termodinamički moguće. Tako je obrat reakcije koju u glikolizi katalizira **heksokinaza** u glukoneogenezi kataliziran **glukoza-6-fosfatazom**, obrat reakcije koju u glikolizi katalizira **fosfofruktokinaza** je kataliziran **fruktoza-1,6-bisfosfatazom**, a obrat reakcije pretvorbe fosfoenolpiruvata u piruvat koju u glikolizi katalizira **piruvat kinaza** je u glukoneogenezi kataliziran s dva enzima – **piruvat karboksilazom** i **fosfoenolpiruvat karboksikinazom**.

Glikoliza i glukoneogeneza su recipročno regulirani procesi, tako da ne mogu teći istovremeno. Aktivnost **fosfofruktokinaze** se inhibira visokom koncentracijom citrata i ATP-a, a aktivira visokom koncentracijom fruktoza-2,6-bisfosfata i AMP-a. Nasuprot tome, aktivnost **fruktoza-1,6-bisfosfataze** aktivira se visokom koncentracijom citrata, a inhibira visokom koncentracijom fruktoza-2,6-bisfosfata i AMP-a. Aktivnosti **piruvat kinaze** i para enzima **piruvat karboksilaze** i **fosfoenolpiruvat karboksikinaze** se također recipročno reguliraju tako da se aktivnost **piruvat kinaze** inhibira visokom koncentracijom ATP-a, dok se aktivnost **piruvat karboksilaze** i **fosfoenolpiruvat karboksikinaze** inhibira visokom koncentracijom ADP-a.

Za shematski prikaz puta glukoneogeneze upućuje se pogledati J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 459.

Primjeri zadataka - glukoneogeneza

1. primjer

Definirajte niz reakcija kojima se polazeći od: a) laktata i b) piruvata može dobiti gliceraldehid-3-fosfat te izračunajte neto bilancu energije za ovu sintezu izraženu ekvivalentima ATP-a.

Rješenje:

a) Laktat se oksidira u piruvat koji ulazi u glukoneogenezu nizom reakcija koje kataliziraju sljedeći enzimi uz utrošak ili dobivanje energije:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--------------------------------------|---------------------|-------------------|
| Laktat dehidrogenaza | +1 NADH | = +1,5 ATP |
| Piruvat karboksilaza | | -1 ATP |
| Fosfoenolpiruvat karboksikinaza | | -1 GTP |
| Fosfoglicerat kinaza | | -1 ATP |
| Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza | -1 NADH | = -1,5 ATP |
| | | Σ -3ATP |

Ukupno se ovim nizom reakcija potroši 3 ekvivalenta ATP-a da bi se iz jedne molekule laktata sintetizirala jedna molekula gliceraldehid-3-fosfata.

b) Piruvat ulazi u glukoneogenezu nizom reakcija koje kataliziraju sljedeći enzimi uz utrošak ili dobivanje energije:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--------------------------------------|---------------------|-------------------|
| Piruvat karboksilaza | | -1 ATP |
| Malat dehidrogenaza (mitohondrijska) | -1 NADH | = -2,5 ATP |
| Malat dehidrogenaza (citosolna) | +1 NADH | = + 1,5 ATP |
| Fosfoenolpiruvat karboksikinaza | | -1 GTP |
| Fosfoglicerat kinaza | | -1 ATP |
| Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza | -1 NADH | = -1,5 ATP |
| | | Σ -5,5 ATP |

Ukupno se ovim nizom reakcija potroši 5,5 ekvivalenata ATP-a da bi se iz jedne molekule piruvata sintetizirala jedna molekula gliceraldehid-3-fosfata.

2. primjer

Izračunajte koliko se molekula glukoze može sintetizirati iz fosfoenolpiruvata na račun energije (izražene brojem ekvivalenata ATP-a) dobivene tako da se dvije molekule α -ketoglutarata uključe u citratni ciklus i razgrade do oksaloacetata.

Rješenje:

U citratni ciklus ulaze dvije molekule α -ketoglutarata i nizom reakcija koje kataliziraju sljedeći enzimi se oslobađa energija u formi ekvivalenata ATP-a:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--------------------------------------|----------------------|------------------------------------|
| α -ketoglutarat dehidrogenaza | +2 NADH | = + 5 ATP |
| Sukcinil-CoA sintetaza | | +2 GTP |
| Sukcinat dehidrogenaza | +2 FADH ₂ | = +3 ATP |
| Malat dehidrogenaza | +2 NADH | = +5 ATP |
| | | Σ +15 ATP |

Dobije se ukupno 15 ekvivalenata ATP iz dvije molekule α -ketoglutarata.

Glukoza se iz fosfoenolpiruvata sintetizira u procesu glukoneogeneze, a reakcije u kojima se troši energija kataliziraju sljedeći enzimi:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--------------------------------------|---------------------|------------------------------------|
| Fosfoglicerat kinaza | | -2 ATP |
| Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza | - 2 NADH | = -3 ATP |
| | | Σ - 5 ATP |

Za jednu molekulu glukoze potrebno je u ovaj niz reakcija uključiti dvije molekule fosfoenolpiruvata i potrošiti 5 ekvivalenata ATP-a.

Omjer dobivene i potrebne energije iznosi:

$$\frac{15}{5} = 3 \text{ glukoze}$$

Stoga se na račun energije dobivene razgradnjom dviju molekula α -ketoglutarata može ukupno sintetizirati 3 molekule glukoze iz fosfoenolpiruvata.

3. primjer

Koliko se molekula fruktoza-6-fosfata može sintetizirati polazeći od dviju molekula laktata na račun energije (izražene brojem ekvivalenata ATP-a) dobivene razgradnjom fruktoza-6-fosfata do sukcinata.

Rješenje:

Fruktoza-6-fosfat se do sukcinata razgrađuje reakcijama koje kataliziraju sljedeći enzimi uz utrošak ili dobivanje energije:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--|---------------------|-------------------|
| fosfofruktokinaza | | -1 ATP |
| gliceraldehid -3-fosfat dehidrogenaza | +2 NADH | = +3 ATP |
| fosfoglicerat kinaza | | +2 ATP |
| piruvat kinaza | | +2 ATP |
| $\Sigma -1\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2\text{ATP} + 2\text{ATP} = 3\text{ATP} + 2\text{NADH}$ $\Sigma 3\text{ATP} + 3\text{ATP} = 6\text{ATP}$ do dvije molekule piruvata | | |
| Piruvat dehidrogenaza | +2 NADH | = +5 ATP |
| $\Sigma \Sigma 6\text{ATP} + 5\text{ATP} = 11\text{ATP}$ do dvije molekule acetil-CoA | | |
| Izocitrat dehidrogenaza | +2 NADH | = +5 ATP |
| α -ketoglutarat dehidrogenaza | +2 NADH | = +5 ATP |
| Sukcnil-CoA sintetaza | | +2 GTP |
| $\Sigma 4\text{NADH} + 2\text{GTP} = 4 \times 2,5 + 2 = 12\text{ATP}$ do dvije molekule sukcinata | | |
| $\Sigma \Sigma 11\text{ATP} + 12\text{ATP} = 23\text{ATP}$ od fruktoza-6-fosfata do dvije molekule sukcinata | | |

Ukupno se razgradnjom jedne molekule fruktoza-6-fosfata do dvije molekule sukcinata dobije 23 ekvivalenta ATP-a.

Sinteza fruktoza-6-fosfata iz dviju molekula laktata odvija se nizom reakcija koje kataliziraju sljedeći enzimi uz utrošak ili dobivanje energije:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| Laktat dehidrogenaza | +2 NADH | = +3 ATP |
| Piruvat karboksilaza | | -2 ATP |
| Fosfoenolpiruvat karboksikinaza | | -2 GTP |
| Fosfoglicerat kinaza | | -2 ATP |
| Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza | -2NADH | = -3 ATP |
| | | $\Sigma -6\text{ATP}$ |

Za jednu molekulu fruktoza-6-fosfata potrebno je u ovaj niz reakcija uključiti dvije molekule laktata i potrošiti 6 ekvivalenata ATP-a.

Omjer dobivene i potrebne energije iznosi:

$$\frac{23}{6} = 3,8 \sim 3 \text{ fruktoza-6-fosfata}$$

Stoga se na račun energije dobivene razgradnjom fruktoza-6-fosfata do sukcinata može ukupno sintetizirati 3 molekule fruktoza-6-fosfata iz laktata.

Zadatci za vježbu - glukoneogeneza

1. Napišite zbirnu jednadžbu glukoneogeneze ako se kreće od: 1. laktata; 2. piruvata te objasnite razliku.
2. Napišite strukturnim formulama sve reakcije glukoneogeneze u kojima dolazi do fosforilacije supstrata.
3. Napišite strukturnim formulama i kemijski definirajte sve reakcije kojima se u glukoneogenezi "zamjenjuju" ireverzibilne reakcije glikolize.
4. Napišite zbirnu jednadžbu glukoneogeneze počevši od malata u stanicama u kojima je inaktivirana triozafosfat izomeraza.
5. Napišite zbirnu jednadžbu i izračunajte utrošak energije ako se kao prekursor za sintezu glukoze u procesu glukoneogeneze koristi fumarat.
6. Napišite strukturnim formulama reakcije preko kojih se regulira brzina glukoneogeneze te navedite odgovarajuće mehanizme regulacije aktivnosti i efektore enzima koji ih kataliziraju.
7. U koju reakciju će ući produkt reakcije piruvat karboksilaze ako je u stanici: a) visok omjer ATP/ADP; b) visok omjer ADP/ATP? Napišite te reakcije strukturnim formulama i objasnite odgovor.
8. Navedene spojeve poredajte slijedom od energetski najnepovoljnijeg prema najpovoljnijem prekursoru za sintezu glukoze: 1. fumarat; 2. alanin; 3. laktat; 4. malat; 5. gliceraldehid-3-fosfat.
9. Objasnite mehanizme kojima se osigurava recipročna regulacija glikolize i glukoneogeneze.
10. Izračunajte neto bilancu energije za sintezu glukoze ako se polazi od: 1. laktata; 2. malata.
11. Napišite strukturnim formulama zbirnu jednadžbu glukoneogeneze počevši od laktata u stanicama u kojima je inaktivna aldolaza.
12. Opišite ulogu fruktoza-2,6-bisfosfata u metabolizmu šećera i napišite glavne reakcije vezane uz tu ulogu.

12. GLIOKSILATNI CIKLUS

U animalnim stanicama citratni ciklus služi za dobivanje energije i preteča za biosintetske reakcije. Kod većine bakterija i biljaka se sinteza preteča odvija putem glioksilatnog ciklusa. Glioksilatni i citratni ciklus imaju neke zajedničke reakcije i međuprodukte i isti osnovni supstrat (acetil-CoA). Međutim, u jedan krug glioksilatnog ciklusa se uključuju dvije jedinice acetil-CoA, a odvija se isključivo u uvjetima kada stanica ima dovoljno energije. To se osigurava alosteričkom aktivacijom *izocitrat liaze* ATP-om, uz istovremenu inaktivaciju *izocitrat dehidrogenaze* u citratnom ciklusu.

Za shematski prikaz glioksilatnog ciklusa upućuje se pogledati J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 496.

Primjeri zadataka – glioksilatni ciklus

1. primjer

Definirajte niz reakcija kojima polazeći od fosfoenolpiruvata možete dobiti sukcinat ako se reakcije odvijaju putem glioksilatnog ciklusa. Izračunajte neto bilancu energije.

Rješenje:

Fosfoenolpiruvat se reakcijama glikolize prevodi u piruvat pa zatim u acetil-CoA koji se dalje uključuje u glioksilatni ciklus i prevodi do sukcinata.

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--------------------------------|---------------------|-------------------|
| piruvat kinaza | | +1 ATP |
| piruvat dehidrogenaza | +1 NADH | = +2,5 ATP |
| | | ∑ 3,5 ATP |

Ovim se nizom reakcija dobije energija ekvivalentna 3,5 ATP-a .

2. primjer

Koliko se molekula fruktoza-6-fosfata može sintetizirati polazeći od dviju molekula laktata na račun energije (izražene u broju molekula ATP-a) dobivene pretvorbom fruktoza-6-fosfata do sukcinata ako se koristi glioksilatni ciklus.

Rješenje:

Fruktoza-6-fosfat se do sukcinata prevodi reakcijama koje kataliziraju sljedeći enzimi uz utrošak ili dobivanje energije:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--|---------------------|-------------------|
| fosfofruktokinaza | | -1 ATP |
| gliceraldehid -3-fosfat dehidrogenaza | +2 NADH | = +3 ATP |
| fosfoglicerat kinaza | | +2 ATP |
| piruvat kinaza | | +2 ATP |
| $\Sigma -1\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2\text{ATP} + 2\text{ATP} = 3\text{ATP} + 2\text{NADH}$ $\Sigma 3\text{ATP} + 3\text{ATP} = 6\text{ATP}$ do dvije molekule piruvata | | |
| piruvat dehidrogenaza | +2 NADH | = +5 ATP |
| $\Sigma \Sigma 5\text{ATP} + 6\text{ATP} = 11\text{ATP}$ do 2 AcCoA | | |
| Malat dehidrogenaza (citosol) | +1 NADH | = +1,5 ATP |
| $\Sigma \Sigma 11\text{ATP} + 1,5\text{ATP} = 12,5\text{ATP}$ | | |

Razgradnjom fruktoza-6-fosfata do jedne molekule sukcinata dobije se energija ekvivalentna 12,5 ATP-a.

Sinteza fruktoza-6-fosfata iz 2 laktata odvija se nizom reakcija koje kataliziraju sljedeći enzimi:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--------------------------------------|---------------------|---|
| Laktat dehidrogenaza | +2 NADH | = +3 ATP |
| Piruvat karboksilaza | | -2 ATP |
| Fosfoenolpiruvat karboksikinaza | | -2 GTP |
| Fosfoglicerat kinaza | | -2 ATP |
| Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza | -2NADH | = -3 ATP |
| | | $\Sigma -6\text{ATP}$ |

Pregradnjom fruktoza-6-fosfata do sukcinata putem glioksilatnog ciklusa se dobije 12,5 ekvivalenta ATP, a za sintezu fruktoza-6-fosfata iz 2 laktata je potrebno utrošiti energiju 6 ekvivalenta ATP-a.

Omjer dobivene i potrebne energije iznosi: $\frac{12,5}{6} = 2,08$

Ukupno se na račun dobivene energije može sintetizirati 2 molekule fruktoza-6-fosfata.

3. primjer

Definirajte niz reakcija kojima se u biljnim stanicama može sintetizirati glukoza iz acetil-CoA i izračunajte: a) koliko se energije (izraženo brojem molekula ATP-a) dobije ili potroši u tom nizu reakcija; b) koliko se acetil-CoA treba uključiti u taj niz reakcija da se sintetiziraju 2 molekule glukoze.

Rješenje:

U jedan krug glioksilatnog ciklusa uključuju se 2 acetil-CoA (1. u reakciji citrat sintaze, 2. u reakciji malat sintaze) i sintetizira se jedan sukcinat koji služi kao preteča za biosinteze. Sukcinat se transportira u citratni ciklus gdje se reakcijama koje kataliziraju sukcinat dehidrogenaza i fumaraza prevodi u malat, malat difundira u citosol i oksidira se u oksaloacetat iz kojega se reakcijama glukoneogeneze sintetizira glukoza.

Za sintezu 1 molekule glukoze potrebna su 2 sukcinata (2 kruga glioksilatnog ciklusa → 4 acetil-CoA).

Sinteza sukcinata iz acetil-CoA odvija se nizom reakcija koje kataliziraju sljedeći enzimi uz utrošak ili dobivanje energije:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|---|------------------------------------|-------------------|
| malat dehidrogenaza (glioksilatni ciklus) | +2 NADH (citosol) | = +3 ATP |
| sukcinat dehidrogenaza | +2 FADH ₂ (mitohondrij) | = +3 ATP |
| malat dehidrogenaza | +2 NADH (citosol) | = +3 ATP |
| fosfoenolpiruvat karboksikinaza | | -2 GTP |
| fosfoglicerat kinaza | | -2 ATP |
| gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza | -2 NADH (citosol) | = - 3 ATP |
| | | Σ +2 ATP |

Ovim nizom reakcija se prilikom sinteze 1 molekule glukoze iz 4 acetil-CoA dobiju 2 ekvivalenta ATP-a. Za sintezu 2 molekule glukoze potrebno je u ovaj niz reakcija uključiti 8 acetil-CoA.

Zadatci za vježbu – glioksilatni ciklus

1. Napišite strukturnim formulama (osim koenzima) zbirnu jednadžbu glioksilatnog ciklusa ako se odvija u stanicama divljeg tipa.
2. Napišite strukturnim formulama (osim koenzima) zbirnu jednadžbu glioksilatnog ciklusa ako se odvija u stanicama kod kojih su inaktivirani geni koji kodiraju za izocitrat-liazu i malat dehidrogenazu.
3. Napišite zbirnu jednadžbu glioksilatnog ciklusa, ako se odvija u stanicama u kojima su inaktivirani geni koji kodiraju za fumarazu i malat dehidrogenazu.
4. Napišite strukturnim formulama reakcije koje su specifične za glioksilatni ciklus.
5. Objasnite kako će na aktivnost izocitrat liaze i izocitrat dehidrogenaze utjecati: 1. visoka koncentracija ATP-a; 2. visoka koncentracija ADPa.
6. Objasnite mehanizme kojima se osigurava potpuna recipročna regulacija izocitrat-liaze i izocitrat-dehidrogenaze.
7. Napišite niz reakcija kojima se iz piruvata može dobiti molekula sukcinata za biosintetske svrhe (kada stanica ima puno energije) u biljnim stanicama.
8. Napišite niz reakcija pretvorbe piruvata u sukcinat u uvjetima kada stanica ima dovoljno energije u: a) animalnim stanicama; b) biljnim stanicama u kojima su inaktivni enzimi piruvat karboksilaza i izocitrat dehidrogenaza. Izračunajte koliko će se tim reakcijama dobiti ili utrošiti energije i objasnite odgovor.
9. Napišite niz reakcija kojima bi iz fruktoze mogli dobiti glioksilat u stanicama u kojima je inaktivna malat sintaza i izračunajte koliko će se molekula ATP-a dobiti ili potrošiti u tom nizu reakcija.
10. Napišite niz reakcija kojima bi iz fruktoza-1-fosfata mogli dobiti glioksilat te sumarnu jednadžbu ovog niza i izračunajte koliko će se energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) dobiti ili potrošiti u tom nizu reakcija.
11. Napišite niz reakcija kojima se u biljnim stanicama može sintetizirati fosfoenolpiruvat iz acetil-CoA.
12. Napišite niz reakcija pretvorbe piruvata u malat u biljnim stanicama u kojima su inaktivni enzimi piruvat karboksilaza i izocitrat dehidrogenaza u uvjetima kada stanica ima dovoljno energije. Izračunajte koliko će se tim reakcijama dobiti ili utrošiti energije.

13. Izračunajte koliko će se energije (izraženo brojem molekula ATP-a) dobiti ili potrošiti u reakcijama kojima će se od glicerol-3-fosfata doći do sukcinata u biljnim stanicama kada stanica: 1.) treba energiju; 2.) ne treba energiju.

13. PUT PENTOZA-FOSFATA

Put pentoza-fosfata sastoji se od dva dijela (ogranka) – oksidativnog i neoksidativnog. Odvija se u citosolu gdje se u oksidativnom ogranku glukoza-6-fosfat nizom reakcija oksidira i dekarboksilira u riboza-5-fosfat uz NADP^+ kao akceptor elektrona. Oksidativni ogranak služi za dobivanje riboze-5-fosfata i reduktivne snage za biosintetske reakcije u formi NADPH. Nakon oksidativnog ogranka u putu pentoza-fosfata slijedi neoksidativni ogranak u kojem se iz tri pentoze sintetiziraju jedna trioza i dvije heksoze. Neoksidativni ogranak povezuje oksidativni ogranak puta pentoza-fosfata s drugim metaboličkim putevima u stanici – prvenstveno s glikolizom i glukoneogenezom. Neoksidativni ogranak ujedno omogućuje uključivanje šećera s četiri, pet ili sedam C atoma u proces glikolize ili glukoneogeneze.

U uvjetima kada stanici treba puno više riboza-5-fosfata nego NADPH glukoza-6-fosfat se neće uključiti u oksidativni ogranak puta pentoza-fosfata nego će se prvo reakcijama glikolize prevesti u fruktoza-6-fosfat i gliceraldehid-3-fosfat koji se zatim uključuju u obrat neoksidativnog dijela puta pentoza-fosfata da bi se sintetizirala riboza-5-fosfat bez nastajanja NADPH.

U uvjetima kada je stanici potrebno puno više NADPH nego riboza-5-fosfata teći će reakcije oksidativnog ogranka puta pentoza-fosfata, kojima će nastati NADPH. Fosfopentoze koje nastanu ovim reakcijama se zatim uključuju u reakcije neoksidativnog ogranka. Produkti neoksidativnog ogranka se na kraju uključuju u glukoneogenezu da bi se iz njih regenerirala glukoza-6-fosfat i vratila u oksidativni dio puta pentoza-fosfata.

Ako stanica treba puno više NADPH nego riboza-5-fosfata, ali istovremeno treba i energiju, produkti neoksidativnog ogranka puta pentoza-fosfata će se uključiti u glikolizu da bi se iz njih iscrpila što veća količina energije.

U slučaju kada stanica treba podjednako NADPH i riboza-5-fosfata odvijat će se samo oksidativni ogranak puta pentoza-fosfata.

Za detaljniji prikaz reakcija puta pentoza-fosfata i povezanosti ovog puta sa putevima glikolize i glukoneogeneze upućuje se pogledati J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 577 -585.

1. primjer

Usporedite koliko se energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) dobije razgradnjom jedne molekule glukoza-6-fosfata do acetilne jedinice ako pri tome: 1. ne dolazi do promjene omjera NADPH / NADP⁺; 2. povećava se omjer NADPH / NADP⁺.

Rješenje:

1. Ako ne dolazi do promjene omjera koncentracija NADPH / NADP⁺ to ukazuje na činjenicu da se glukoza-6-fosfat neće uključivati u oksidativni ogranak puta pentoza-fosfata nego se razgrađuje do acetilnih jedinica putem glikolize i reakcije koju katalizira piruvat dehidrogenaza. U glikolizi se odvija niz reakcija koje kataliziraju sljedeći enzimi uz utrošak ili dobivanje energije:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--|---------------------|-------------------|
| Fosfofruktokinaza | | -1 ATP |
| Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza | +2 NADH (citosolni) | = +3 ATP |
| Fosfoglicerat kinaza | | +2 ATP |
| Piruvat kinaza | | +2 ATP |
| $\sum -1 \text{ ATP} + 2 \text{ NADH(citosolni)} + 2 \text{ ATP} + 2 \text{ ATP} = 3 \text{ ATP} + 2 \text{ NADH (citosolni)}$ | | |
| $\sum 3 \text{ ATP} + (2 \times 1,5 \text{ ATP}) = 6 \text{ ATP do 2 piruvata}$ | | |

Reakcijom piruvat dehidrogenaze u mitohondriju se oksidacijom i dekarboksilacijom 2 piruvata dobiju 2 acetilne jedinice i 2 mitohondrijska NADH. Oksidacijom dobivenog NADH u procesu oksidacijske fosforilacije dobije se energija dovoljna za sintezu 5 ATP-a.

$$\sum 2 \times 2,5 = 5 \text{ ekvivalenata ATP}$$

Ukupno se ovim nizom reakcija dobije:

$$\sum \sum 6\text{ATP} + 5 \text{ ATP} = 11 \text{ ekvivalenata ATP od glukoza-6-fosfata do 2 acetil-CoA}$$

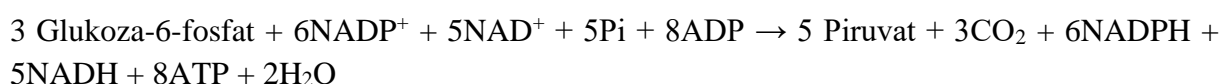
2. Ako dolazi do povećanja omjera NADPH/NADP⁺ to ukazuje na činjenicu da se glukoza-6-fosfat razgrađuje do acetilnih jedinica tako da prvo prolazi kroz oksidativni ogranak puta pentoza-fosfata u kojem se po molekuli glukoza-6-fosfata dobiju dvije molekule NADPH. Ribosa-5-fosfat se zatim uključuje u neoksidativni ogranak puta pentoza-fosfata čiji se konačni produkti uključuju u glikolizu do piruvata i zatim reakcijom koju katalizira piruvat

dehidrogenaza prevode u acetilne jedinice. Da bi se ovaj niz reakcija mogao stehiometrijski odvijati u oksidativni ogranak puta pentoza-fosfata moraju ući 3 molekule glukoza-6-fosfata.

Produkti neoksidativnog ogranka su 2 molekule fruktoza-6-fosfata i jedan gliceraldehid-3-fosfat. Ovi produkti se uključuju u glikolizu. Reakcije u kojima se troši ili dobiva ATP i ekvivalenti ATP-a katalizirane su sljedećim enzimima glikolize:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a | |
|---|---------------------|-------------------|-----|
| Fosfofruktokinaza | | -1 ATP | x 2 |
| Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza | +1 NADH citosolni | = + 1,5 ATP | x 5 |
| Fosfoglicerat kinaza | | +1 ATP | x 5 |
| Piruvat kinaza | | +1 ATP | x 5 |
| $\sum -2 \text{ ATP} + 5 \text{ NADH} + 5 \text{ ATP} + 5 \text{ ATP} = 8 \text{ ATP} + 5 \text{ NADH}$ | | | |
| $\sum 8 \text{ ATP} + 7,5 \text{ ATP} = 15,5 \text{ ekvivalenata ATP do 5 piruvata}$ | | | |

Zbirna jednačba ovog niza reakcija pretvorbe glukoza-6-fosfata do piruvata glasi:



Reakcijom piruvat dehidrogenaze u mitohondriju i oksidacijom dobivenog NADH u oksidacijskoj fosforilaciji dobije se:

$$\sum 5 \times 2,5 = 12,5 \text{ ekvivalenata ATP}$$

Ukupna količina energije dobivena ovim putem:

$$\sum \sum 15,5 \text{ ATP} + 12,5 \text{ ATP} = 28 \text{ ekvivalenata ATP razgradnjom 3 Glukoza-6-fosfata do 5 acetil-CoA}$$

Energija dobivena razgradnjom jedne molekule glukoza-6-fosfata iznosi:

$$\frac{28}{3} = 9,3 \text{ ekvivalenta ATP-a}$$

Razgradnjom glukoza-6-fosfata do acetilnih jedinica uz povećanje omjera NADPH / NADP⁺ dobije se manje energije nego razgradnjom bez povećanja omjera NADPH / NADP⁺ jer se dio energije pri tome utroši za redukciju NADP⁺ u NADPH.

2. primjer

Definirajte niz reakcija kojima bi polazeći od piruvata mogli dobiti ribozu-5-fosfat: a) uz redukciju NADP⁺; b) bez redukcije NADP⁺. Izračunajte koliko će se molekula ATP-a dobiti ili potrošiti u slučaju a) odnosno b).

Rješenje:

a) u prvom slučaju se odvija glukoneogeneza iz 2 piruvata do glukoze-6-fosfata nakon čega slijedi oksidativni ogranak puta pentoza-fosfata. Reakcije u kojima se troši ili dobiva ATP i ekvivalenti ATP-a katalizirane su sljedećim enzimima glukoneogeneze:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--|---------------------|-------------------|
| Piruvat karboksilaza | | -2 ATP |
| Malat dehidrogenaza (mitohondrijska) | -2 NADH | = -5 ATP |
| Malat dehidrogenaza (citosolna) | +2 NADH | = +3 ATP |
| Fosfoenolpiruvat karboksikinaza | | = -2 GTP |
| Fosfoglicerat kinaza | | -2 ATP |
| Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (citosol) | -2 NADH | |
| | | Σ -11 ATP |

Zbrina jednadžba oksidativnog ogranka puta pentoza-fosfata:



Ukupno se ovim nizom reakcija potroši 11 ekvivalenata ATP za jednu molekulu riboza-5-fosfata.

b) U drugom slučaju se odvija glukoneogeneza iz 5 piruvata do 2 fruktoza-6-fosfata i jednog gliceraldehid-3-fosfata nakon čega slijedi obrat neoksidativnog ogranka do 3 riboza-5-fosfata. Reakcije u kojima se troši ili dobiva energija katalizirane su sljedećim enzimima:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--|---------------------|--------------------|
| Piruvat karboksilaza | | -5 ATP |
| Malat dehidrogenaza (mitohondrijska) | -5 NADH | = -12,5 ATP |
| Malat dehidrogenaza (citosolna) | +5 NADH | = +7,5 ATP |
| Fosfoenolpiruvat karboksikinaza | | = -5 GTP |
| Fosfoglicerat kinaza | | -5 ATP |
| Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (citosol) | -5 NADH | = - 7,5 ATP |
| | | Σ -27,5 ATP |

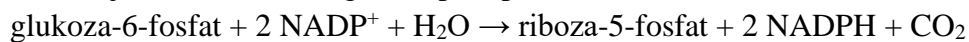
Ukupno se ovim putem potroši 27,5 ekvivalenata ATP-a za 3 riboza-5-fosfata tj. 9 ekvivalenata ATP-a za jednu molekulu riboze-5-fosfata.

3. primjer

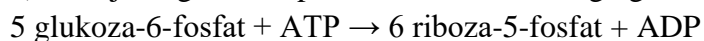
Napišite zbirne jednadžbe pretvorbe glukoza-6-fosfata u slučaju kada je: a) potrebno podjednako NADPH i riboza-5-fosfata; b) potrebna riboza-5-fosfat, a ne treba NADPH; c) potrebna energija, a ne treba NADPH; d) potrebna energija i NADPH; e) potreban NADPH, a ne treba riboza-5-fosfat.

Rješenje:

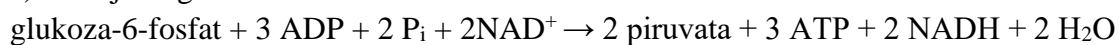
a) Odvija se oksidativni ogranak puta pentoza-fosfata:



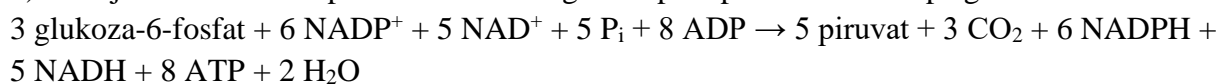
b) Odvija se glikoliza pa obrat neoksidativnog ogranka puta pentoza-fosfata:



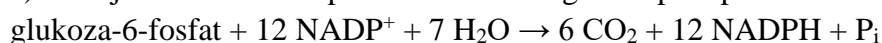
c) Odvija se glikoliza:



d) Odvija se oksidativni pa neoksidativni ogranak puta pentoza-fosfata pa glikoliza:



e) Odvija se oksidativni pa neoksidativni ogranak puta pentoza-fosfata pa glukoneogeneza:



Zadatci za vježbu – put pentoza-fosfata

1. Napišite strukturnim formulama reakciju pentoza-fosfatnog puta koja je po mehanizmu najsličnija reakciji koju katalizira izocitrat-dehidrogenaza u citratnom ciklusu.
2. Napišite strukturnim formulama (osim koenzima) i kemijski definirajte sve reakcije oksidativnog ogranka puta pentoza-fosfata.
3. Izračunajte koliko energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) se dobije razgradnjom tri molekule glukoza-6-fosfata do acetilnih jedinica ako se pri tome povećava omjer NADPH/NADP⁺ u stanici.
4. Izračunajte koliko energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) se dobije razgradnjom tri molekule glukoza-6-fosfata do odgovarajućeg broja molekula acetoacetata ako se pri tome povećava omjer NADPH / NADP⁺ u stanici.
5. Izračunajte koliko će se energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) dobiti ili potrošiti u nizu reakcija sinteze riboza-5-fosfata iz glicerola ako je u stanicama visoka koncentracija NADPH.
6. Napišite zbirnu jednadžbu pretvorbe glukoze u uvjetima kada stanica ne treba riboza-5-fosfat, a treba NADPH i energiju u stanicama u kojima je inaktivna enolaza.
7. Napišite zbirnu jednadžbu pretvorbe glukoze u uvjetima kada stanica ne treba riboza-5-fosfat, a treba energiju i NADPH, u stanicama u kojima je inaktivna fosfoglicerat mutaza.
8. Napišite zbirne jednadžbe pretvorbe glukoze u slučaju kada stanica treba NADPH i energiju, a ne treba riboza-5-fosfat u stanicama u kojima je inaktivna fosfoglicerat kinaza.
9. Napišite zbirnu jednadžbu potpune razgradnje riboza-5-fosfata (do CO₂).
10. Napišite zbirne jednadžbe pretvorbe fruktoza-6-fosfata u slučaju kada stanica treba riboza-5-fosfat i energiju, a ne treba NADPH.
11. Napišite zbirnu jednadžbu: 1. oksidativnog ogranka pentoza-fosfatnog puta; 2. neoksidativnog ogranka pentoza-fosfatnog puta.
12. Napišite zbirnu jednadžbu pretvorbe glukoze u uvjetima kada stanica ne treba riboza-5-fosfat, a treba NADPH i energiju u stanicama u kojima je inaktivna gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza.
13. Napišite zbirne jednadžbe pretvorbe glicerol-3-fosfata kojima bi dobili: 1. NADPH bez dobitka riboza-5-fosfata; 2. NADPH i energiju bez dobitka riboza-5-fosfata.

14. Izračunajte koliko mililitara kisika se utroši za potpunu oksidaciju 5g riboze uz iskorištenje postupka 40 %? (M_r riboze = 150,13)

14. FOTOSINTEZA

Proces fotosinteze se može podijeliti na reakcije na svjetlu (svjetlosne reakcije) i reakcije u tami (Calvinov ciklus). Svjetlosne reakcije proizvode O₂, NADPH i ATP, dok reakcije u tami upotrebljavaju sintetizirani NADPH i ATP za redukciju CO₂ što rezultira sintezom šećera. Reakcije na svjetlu su slične reakcijama oksidacijske fosforilacije jer u oba procesa tok visokoenergijskih elektrona kroz lanac za prijenos elektrona stvara proton-motornu silu koja zatim pokreće sintezu ATP-a djelovanjem ATP-sintaze. Međutim, dok se u procesu oksidacijske fosforilacije energiju i elektrone dobiva oksidacijom molekula supstrata (šećera, masti, proteina) do CO₂, u fotosintezi su izvor energije fotoni. Energiju svjetlosti sakupljaju specijalizirane molekule pigmeta - klorofili. Svjetlosna energija koju upiju klorofili se složenim sustavom, u kojem sudjeluje velik broj proteinskih kompleksa i drugih molekula prenositelja, upotrebljava za dobivanje visokoenergijskih elektrona iz vode uz istovremenu proizvodnju O₂. Na račun apsorbirane energije se sintetizira NADPH te stvara gradijent protona na tilakoidnoj membrani koji će omogućiti sintezu ATP-a djelovanjem ATP-sintaze. U tilakoidnim membranama u kloroplastima biljaka se razlikuju dva fotosustava – *fotosustav I* (PS I) koji pobuđuje svjetlost valnih duljina ispod 700 nm, i *fotosustav II* (PS II) koji pobuđuje svjetlost valnih duljina ispod 680 nm (detaljniji opis PSI i PSII pogledati u J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 548 – 553.). *Fotosustav I* koristi visokoenergijske elektrone za redukciju NADP⁺ u NADPH. Elektroni potrebni za redukciju NADP⁺ potječu iz *fotosustava II*. *Fotosustav II* preuzima elektrone s molekula H₂O. Stoga kao nusprodukt djelovanja *fotosustava II* nastaju molekule O₂. Elektroni putuju sa *fotosustava II* na *fotosustav I* preko membranskog proteinskog kompleksa *citokroma bf*, koji je homologan *kompleksu III* u procesu oksidativne fosforilacije. *Citokrom bf* generira gradijent protona na tilakoidnoj membrani što pokreće sintezu ATP-a. Sumarno gledano apsorpcijom četiri fotona na *fotosustavu II* stvara se jedna molekula O₂ i otpuštaju četiri protona u tilakoidnom prostoru.

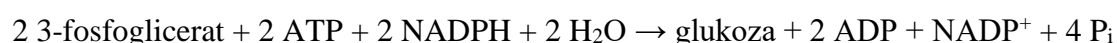
Dvije molekule reduciranog plastokinona oksidiraju se predajući elektrone na kompleks *citokroma bf*, pri čemu se prebacuje još 8 protona u tilakoidni prostor. Apsorpcijom još 4 fotona u *fotosustavu I* dolazi do prijenosa četiri elektrona s plastocijanina na feredoksin. Četiri reducirana feredoksina reduciraju dvije molekule NADP⁺ u NADPH, uz vezanje još dva protona iz strome prilikom redukcije NADP⁺. Dvanaest protona prebačenih u tilakoidni prostor teče kroz FC₀ podjedinicu ATP-sintaze natrag u stromu, pri čemu se sintetizira 3 ATP-a (4

protona / ATP-u). Tih 12 protona su unesena u tilakoidni lumen na račun energije 8 fotona, što znači da je za sintezu 3 ATP-a potrebno 8 fotona (2,7 fotona / ATP).

Pri visokoj koncentraciji NADPH elektroni koji dolaze s *fotosustava I* se mogu alternativno usmjeriti tako da se putem *citokrom bf* kompleksa vrate na *fotosustav I* čime se krug zatvara bez sinteze NADPH. Ovaj proces se naziva *cikličkom fotofosforilacijom* jer se njime stvara proton-motorna sila koja se koristi za sintezu ATP-a. U ovom procesu dolazi do sinteze ATP-a bez istovremene sinteze NADPH, a kako u prijenosu elektrona ne sudjeluje *fotosustav II* nema niti nastajanja O₂ iz vode. Ciklička fotofosforilacija je produktivnija s obzirom na sintezu ATP-a, jer se na račun apsorpcije 4 fotona u *fotosustavu I* otpušta 8 protona u tilakoidni lumen putem kompleksa *citokroma bf*. Vraćanjem tih protona kroz ATP-sintazu nastaju dvije molekule ATP-a. Iz toga proizlazi da su za sintezu jednog ATP-a procesom cikličke fotofosforilacije dovoljna dva fotona.

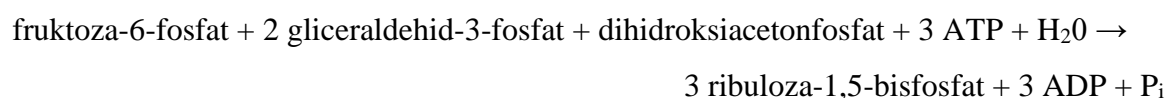
Calvinov ciklus odvija se u stromi kloroplasta i obuhvaća reakcije kojima se iz CO₂ sintetizira glukoza uz utrošak ATP-a i NADPH nastalih tijekom odvijanja reakcija fotosinteze na svjetlu. Calvinov ciklus ima tri faze: fazu fiksacije CO₂ na ribuloza-1,5-bisfosfat pri čemu nastaju dvije molekule 3-fosfoglicerata, fazu redukcije 3-fosfoglicerata u šećer heksozu i fazu regeneracije ribuloza-1,5-bisfosfata.

Sumarna jednažba sinteze glukoze iz 3-fosfoglicerata glasi:



U trećoj fazi Calvinovog ciklusa regenerira se ribuloza-1,5-bisfosfat tako da iz jedne molekule fruktoza-6-fosfata, dihidroksiacetonfosfata i dva gliceraldehid-3-fosfata nastaju tri molekule ribuloza-1,5-bisfosfata nizom reakcija koje kataliziraju *tranketolaza* i *aldolaza*.

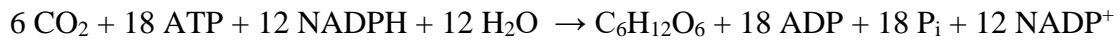
Sumarna jednažba ovog niza reakcija je:



Za stehiometrijski uravnotežen krug Calvinovog ciklusa potreban je ulazak 6 CO₂ u prvu fazu ciklusa jer su za sintezu jedne glukoze potrebne dvije trioze, dok je za regeneraciju 6 ribuloza-1,5-bisfosfata potrebno 10 trioza. Kondenzacijom 6 CO₂ i 6 ribuloza-1,5-bisfosfata dobije se 12 triozafosfata od kojih dva odlaze u sintezu heksoze. Od preostalih 10 triozafosfata četiri služe za sintezu dviju fruktoza-6-fosfata, a preostalih 6 se u treću fazu Calvinovog ciklusa uključuju kao četiri gliceraldehid-3-fosfata i dva dihidroksiacetonfosfata. Na taj način se u trećoj fazi ciklusa regenerira 6 pentoza-fosfata koji se zatim izomeriziraju / epimeriziraju u 6

ribuloza-5-fosfata i fosforiliraju u 6 ribuloza-1,5-bisfosfata čime je krug zatvoren. U cijelom ciklusu se potroši 18 ATP-a i 12 NADPH tj. za ugradnju jedne molekule CO₂ u heksozu se potroši tri ATP-a i dva NADPH.

Zbirna jednadžba Calvinovog ciklusa glasi:



Za detalje o reakcijama fotosinteze, fotosustavima i Calvinovom ciklusu upućuje se pogledati J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 541 – 575.)

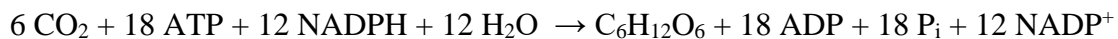
Primjeri zadataka - fotosinteza

1. primjer

Izračunajte koliko se mL CO₂ utroši za sintezu 1 g glukoze u Calvinovom ciklusu ($M_{\text{r,glukoze}} = 180$).

Rješenje:

Za sintezu 1 mola glukoze Calvinovim ciklusom potrebno je 6 molova CO₂



Broj molova glukoze u 1 g glukoze iznosi:

$$n_{\text{glukoze}} = \frac{1}{180} = 0,0056 \text{ mol}$$

Potreban broj molova CO₂ je 6 puta veći od broja molova glukoze i iznosi:

$$6 \times 0,0056 = 0,0336 \text{ mol}$$

Potreban volumen CO₂ se izračuna iz molarnog volumena plina:

$$V = V_m \times n = 22,414 \frac{\text{L}}{\text{mol}} \times 0,0336 \text{ mol} = 0,753 \text{ L}$$

Volumen CO₂ potreban za sintezu 1 g glukoze Calvinovim ciklusom iznosi 753 mL.

2. primjer

Izračunajte koliko je fotona potrebno apsorbirati u reakcijama fotosinteze na svjetlu da se na račun njihove energije dobije dovoljan broj ATP-a za sintezu 3 molekule glukoze u uvjetima: a) visokog omjera koncentracija NADPH/NADP⁺ u kloroplastima; b) niskog omjera koncentracija NADPH/NADP⁺ u kloroplastima.

Rješenje:

a) pri visokom omjeru koncentracija NADPH/NADP⁺ odvija se ciklička fotofosforilacija pri čemu je za sintezu jednog ATP-a potrebno apsorbirati dva fotona u fotosustavu I. Budući da je za sintezu 1 glukoze potrebno 18 ATP, ukupno je za 3 glukoze potrebno $3 \times 18 = 54$ ATP-a. Za svaki ATP je u ovom slučaju potrebno apsorbirati po dva fotona pa je ukupni broj fotona koje treba apsorbirati 108.

b) pri niskom omjeru koncentracija NADPH/NADP⁺ u kloroplastima aktivna su oba fotosustava što znači da je za sintezu 3 ATP-a potrebno apsorbirati energiju 8 fotona. Budući da je potrebno ukupno 54 ATP-a, za sintezu 3 glukoze trebat će apsorbirati 144 fotona.

$$\begin{array}{l} x \text{ fotona} \rightarrow 54 \text{ ATP-a} \\ \hline 8 \text{ fotona} \rightarrow 3 \text{ ATP-a} \\ x = 144 \text{ fotona} \end{array}$$

Zadatci za vježbu – fotosinteza

1. Izračunajte koliko je fotona potrebno apsorbirati u reakcijama fotosinteze da bi se sintetizirao jedan mol O_2 .
2. Izračunajte koliko je fotona potrebno apsorbirati u reakcijama fotosinteze u uvjetima niskog omjera koncentracija $NADPH/NADP^+$ u kloroplastima da se na račun njihove energije dobije 1 mol ATP-a.
3. Izračunajte koliko je fotona potrebno apsorbirati u reakcijama fotosinteze u uvjetima visokog omjera koncentracija $NADPH/NADP^+$ u kloroplastima da se na račun njihove energije dobije 1 mol ATP-a.
4. Izračunajte koliko je fotona potrebno apsorbirati u reakcijama fotosinteze da bi se reducirao jedan mol $NADP^+$.
5. Izračunajte koliko je fotona potrebno apsorbirati u reakcijama fotosinteze da bi se oksidirao jedan mol H_2O .
6. Naznačite koja od zbirnih jednadžbi prikazuje sintezu glukoze u Calvinovom ciklusu počevši od riboza-5-fosfata i CO_2 kao prekursora:
 - a) $2 \text{ riboza-5-fosfat} + 3 \text{ ATP} + 2 \text{ NADPH} + 2 \text{ CO}_2 + 3 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{ glukoza} + 3 \text{ ADP} + 2 \text{ NADP}^+ + 5 \text{ Pi}$
 - b) $\text{riboza-5-fosfat} + 2 \text{ ATP} + 2 \text{ NADPH} + \text{CO}_2 + 3 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{glukoza} + 2 \text{ ADP} + 2 \text{ NADP}^+ + 3 \text{ Pi}$
 - c) $\text{riboza-5-fosfat} + 3 \text{ ATP} + 2 \text{ NADPH} + \text{CO}_2 + 3 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{glukoza} + 3 \text{ ADP} + 2 \text{ NADP}^+ + 4 \text{ Pi}$
 - d) $\text{riboza-5-fosfat} + \text{ATP} + 2 \text{ NADPH} + \text{CO}_2 + 3 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{glukoza} + \text{ADP} + 2 \text{ NADP}^+ + 2 \text{ Pi}$
 - e) $2 \text{ riboza-5-fosfat} + 2 \text{ ATP} + 3 \text{ NADPH} + 2 \text{ CO}_2 + 3 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{ glukoza} + 2 \text{ ADP} + 3 \text{ NADP}^+ + 3 \text{ Pi}$
 - f) $\text{riboza-5-fosfat} + 2 \text{ ATP} + 3 \text{ NADPH} + \text{CO}_2 + 3 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{glukoza} + 2 \text{ ADP} + 3 \text{ NADP}^+ + 3 \text{ Pi}$
 - g) $\text{riboza-5-fosfat} + 3 \text{ ATP} + \text{NADPH} + \text{CO}_2 + 3 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{glukoza} + 3 \text{ ADP} + \text{NADP}^+ + 4 \text{ Pi}$
 - h) $\text{riboza-5-fosfat} + 2 \text{ ATP} + \text{NADPH} + \text{CO}_2 + 3 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{glukoza} + 2 \text{ ADP} + \text{NADP}^+ + 3 \text{ Pi}$
7. Izračunajte koliko se molova CO_2 mora uključiti u Calvinov ciklus da bi se sintetiziralo 2 mg glukoze ($Mr_{\text{glukoze}} = 180$).
8. Izračunajte koliko se molova ATP-a mora uključiti u Calvinov ciklus da bi se sintetiziralo 2 mg glukoze ($Mr_{\text{glukoze}} = 180$).
9. Izračunajte koliko se molova NADPH mora oksidirati u Calvinovom ciklusu da bi se sintetiziralo 2 mg glukoze ($Mr_{\text{glukoze}} = 180$).
10. Izračunajte koliko molova glukoze se može sintetizirati u Calvinovom ciklusu ako se u njega uključi 1,5 mL CO_2 .

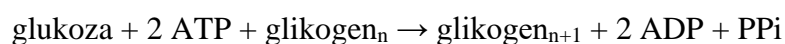
15. GLIKOGEN

Razgradnja i sinteza glikogena odvijaju se različitim metaboličkim putevima. Ugradnja glukoze u glikogen zahtijeva sintezu glikozidne veze tj. unos energije da bi nastala kovalentna veza između dvije molekule glukoze. Glukoza se prvo fosforilira u reakciji s molekulom ATP-a u glukoza-6-fosfat. Ovu reakciju katalizira enzim **glukokinaza**. Nakon toga slijedi reakcija pregradnje glukoza-6-fosfata u glukoza-1-fosfat. Ovu reakciju katalizira enzim **fosfoglukomutaza**. Glukoza-1-fosfat zatim ulazi u reakciju s molekulom uridin-3-fosfata (UTP) pri čemu nastaje UDP-glukoza i PP_i. Reakciju katalizira enzim **fosforilaza UDP-glukoze**. Enzim **glikogen sintaza**, koji sintetizira glavninu glikogena, ne može početi sintezu od prve glukozne jedinice već mu je potrebna "klica" duljine minimalno 4 glukozna ostatka. Klicu sintetizira enzim **glikogenin** nakon čega daljnje produljenje lanca preuzima **glikogen sintaza**.

Razgranjenja u rastući lanac glikogena unosi enzim **glukano-1,6-transferaza (enzim grananja)** koji prenosi dio lanca duljine 7 glukoznih jedinica dublje u unutrašnjost molekule glikogena. Ova reakcija je moguća ako je ravnolančani dio glikogena dugačak najmanje 11 glukoznih jedinica jer **glukano-1,6-transferaza** odcijepljeni komad lanca veže α-1,6-glikozidnom vezom na udaljenost od najmanje 4 glukozna ostatka od postojećeg mjesta razgranjenja. Ovaj enzim cijepa α-1,4-glikozidnu vezu, a sintetizira α-1,6-glikozidnu vezu.

Za ugradnju jedne glukoze u lanac glikogena potrebno je potrošiti ukupno dvije visokoenergetske veze. Jedna molekula ATP-a se koristi za fosforilaciju glukoze u glukoza-6-fosfat koja se potom izomerizira u glukoza-1-fosfat. Iz glukoza-1-fosfata se sintetizira UDP-glukoza uz utrošak UTP-a u reakciji kataliziranoj **fosforilazom UDP-glukoze**. Reakciju regeneracije UDP-a u UTP katalizira enzim **nukleozid difosfokinaza** pri čemu se troši druga molekula ATP-a.

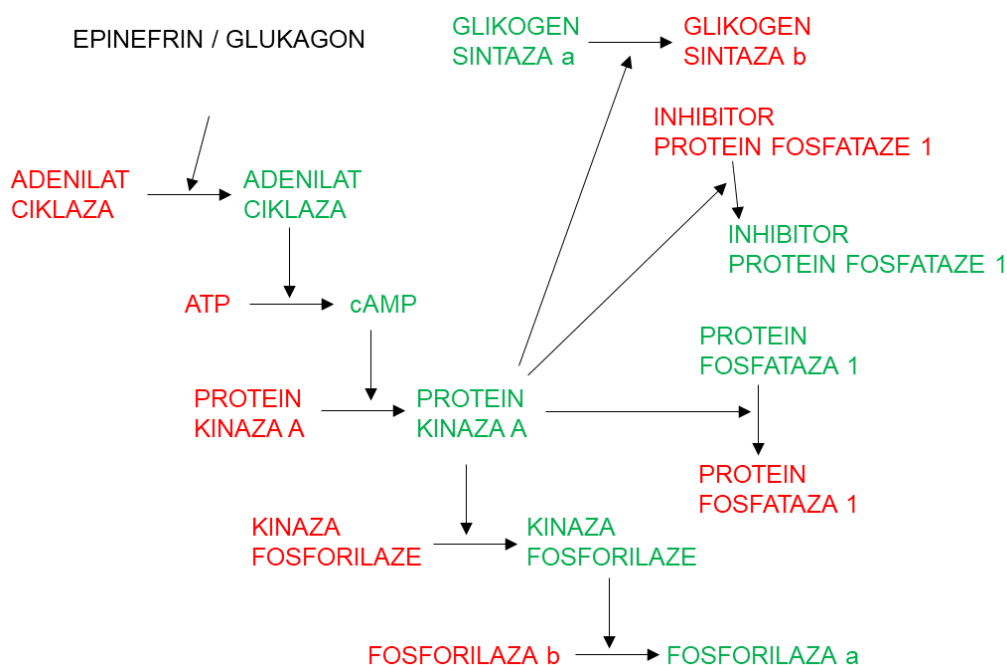
Sumarna jednačba sinteze glikogena glasi:



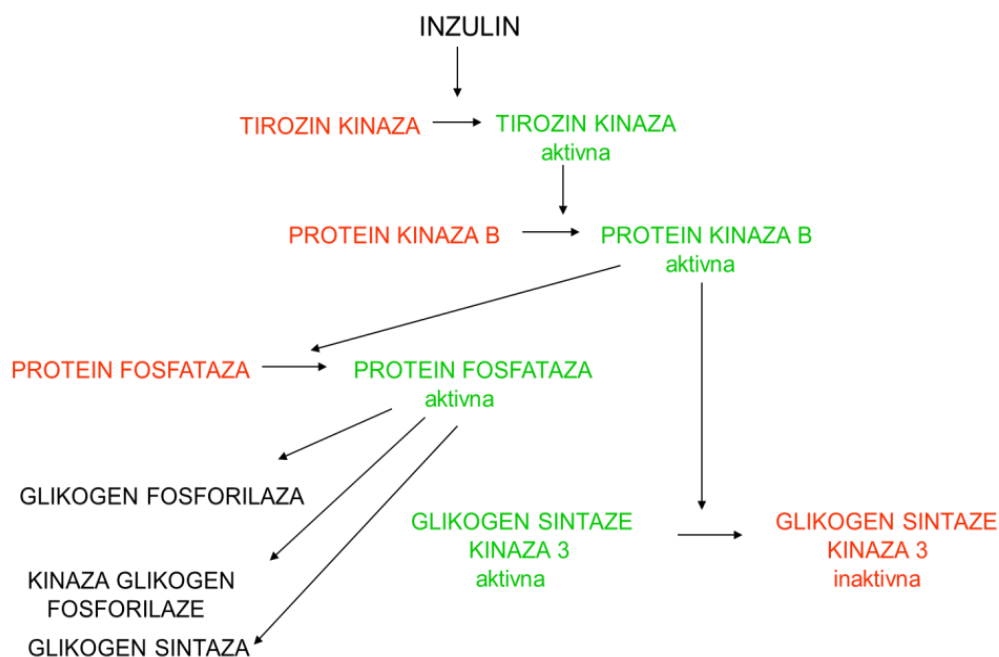
Razgradnja glikogena teče s nereducirajućih krajeva djelovanjem enzima **glikogen fosforilaze**. Ovaj enzim fosforolitički cijepa α-1,4-glikozidnu vezu čime nastaje glukoza-1-fosfat i lanac glikogena kraći za jednu glukoznu jedinicu. Reakcija staje kada se glikogen fosforilaza približi na četiri glukozne jedinice od mjesta grananja. Tada se u razgradnju uključuje enzim **transferaza** koji prenosi grupu od 3 glukozne jedinice iz ogranka na

nereducirajući kraj drugog lanca. Glukoza vezana α -1,6-glikozidnom vezom u točki razgranjenja se odcjepljuje hidrolitički u reakciji koju katalizira *α -1,6-glukozidaza*. Za detaljniji prikaz reakcija sinteze i razgradnje glikogena upućuje se pogledati J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 592-611.)

Razgradnja i sinteza glikogena reguliraju se kaskadom reakcija koja započinje odgovarajućim hormonalnim signalom i ovisi o koncentraciji raspoložive glukoze. Kod niske koncentracije glukoze hormoni glukagon i epinefrin (adrenalin) pokreću kaskadu reakcija koja dovodi do pokretanja razgradnje i zaustavljanja sinteze glikogena (slika 8). Kod visoke koncentracije glukoze hormon inzulin pokreće drugu kaskadu reakcija koja rezultira poticanjem sinteze i zaustavljanjem razgradnje glikogena (slika 9).



Slika 8. Djelovanje glukagonske / epinefrinske kaskade na sintezu i razgradnju glikogena



Slika 9. Djelovanje inzulinske kaskade na aktivnost enzima za sintezu i razgradnju glikogena

Primjeri zadataka - glikogen

1. primjer

Navedite: a) sve supstrate *protein fosfataze 1* (PP1) te objasnite kakav je učinak PP1 na njihovu aktivnost; b) sve enzime i proteine neposredno uključene u regulaciju aktivnosti PP1, u kojim su uvjetima aktivni i kakav je njihov učinak na aktivnost PP1.

Rješenje:

- | | |
|--------------------------------------|--|
| a) - <i>Glikogen fosforilaza</i> | PP1 inaktivira glikogen fosforilazu |
| - <i>Kinaza glikogen fosforilaze</i> | PP1 inaktivira kinazu glikogen fosforilaze |
| - <i>Glikogen sintaza</i> | PP1 aktivira glikogen sintazu |

- b) - *protein kinaza A* fosforilacijom inhibira PP1 pri niskoj koncentraciji glukoze
 - *inhibitor protein fosfataze 1* inaktivira PP1 pri niskoj koncentraciji glukoze
 - *protein kinaza B* aktivira PP1 pri visokoj koncentraciji glukoze

2. primjer

Navedite sve supstrate *protein kinaze B* i objasnite kakav je utjecaj *protein kinaze B* na njihovu aktivnost i na koncentraciju glikogena u stanici.

Rješenje:

Supstrati *protein kinaze B* su *glikogen sintaza kinaza 3* i *protein fosfataza 1*. *Protein kinaza B* fosforilacijom inaktivira *glikogen sintaza kinazu 3*. *Protein kinaza B* fosforilacijom aktivira *protein fosfatazu 1*. Inaktivirana *glikogen sintaza kinaza 3* neće moći inhibirati *glikogen sintazu*; aktivirana *protein fosfataza 1* će defosforilacijom svojih supstrata (*glikogen fosforilaze, kinaze glikogen fosforilaze i glikogen sintaze*) dovesti do zaustavljanja razgradnje glikogena i aktivacije *glikogen sintaze*. U konačnici dolazi do porasta koncentracije glikogena.

3. primjer

Objasnite kako bi se delecija gena za *protein fosfatazu 1* odrazila na aktivnost enzima uključenih u metabolizam glikogena i koncentraciju glikogena u stanicama.

Rješenje:

Nedostatak *protein fosfataze 1* će značiti da u uvjetima aktivacije inzulinske kaskade (pri visokoj koncentraciji glukoze) *protein kinaza B* inaktivira fosforilacijom *glikogen sintaza kinazu 3*, ali ne može aktivirati *protein fosfatazu 1* (koje nema). Posljedica je da neće doći do defosforilacije *glikogen fosforilaze, kinaze glikogen fosforilaze i glikogen sintaze* pa će razgradnja glikogena stalno teći, a sinteza glikogena se neće moći pokrenuti bez obzira na promjenu uvjeta odnosno koncentraciju glukoze. U takvim stanicama se neće moći sintetizirati glikogen jer je *glikogen sintaza* stalno inaktivna (fosforilirana), a *glikogen fosforilaza* bi ga stalno razgrađivala jer je uvijek aktivna (fosforilirana). Sumarno u tim stanicama bi koncentracija glikogena bila jednaka nuli.

Zadatci za vježbu – glikogen

1. Navedite sve supstrate *protein kinaze A* u metabolizmu glikogena i objasnite kakav je utjecaj *protein kinaze A* na njihovu aktivnost i na koncentraciju glikogena u stanici.
2. Objasnite kako će se na metabolizam glikogena odraziti nagli porast koncentracije cAMP-a i AMP-a u stanicama koje sadrže mutiranu *kinazu glikogen fosforilaze* kod koje je Ser koji podliježe fosforilaciji zamijenjen s alaninom.
3. Objasnite kako će se na metabolizam glikogena odraziti nagli porast koncentracije glukoze u stanicama koje sadrže mutiranu *glikogen sitaza kinazu 3* kod koje je Ser koji podliježe fosforilaciji zamijenjen s Ala.
4. Objasnite kako će se na metabolizam glikogena odraziti nagli porast koncentracije cAMP-a u stanicama koje sadrže mutiranu *glikogen fosforilazu* kod koje je Ser koji podliježe fosforilaciji zamijenjen s Ala ako uz porast koncentracije cAMP-a poraste i koncentracija Ca^{2+} iona.
5. Objasnite kako će se na metabolizam glikogena odraziti nagli porast koncentracije glukoze u stanicama koje sadrže mutiranu *glikogen fosforilazu* koja ne može vezati glukozu.
6. Navedite sve enzime uključene u regulaciju metabolizma glikogena koji podliježu regulaciji „inzulinskom kaskadom“, objasnite mehanizam regulacije aktivnosti tih enzima te kakav je njihov utjecaj na metabolizam glikogena.
7. Opišite i objasnite proces aktivacije: 1. *adenilat ciklaze*; 2. *protein kinaze A*.
8. Navedite sve enzime potrebne za potpunu razgradnju dijela molekule glikogena unutar kojeg je lanac od 7 glukoznih ostataka vezan α -1,6-glikozidnom vezom na glavni lanac duljine 14 glukoznih ostataka. Napišite strukturnim formulama reakcije koje katalizira svaki od navedenih enzima i navedite sve produkte dobivene ovom razgradnjom.
9. Navedite sve enzime koji direktno sudjeluju u razgradnji i sintezi glikogena te napišite reakciju koju svaki od njih katalizira.

16. METABOLIZAM MASNIH KISELINA

16.1. Razgradnja masnih kiselina

Masne kiseline se u stanicama skladište u formi triacilglicerola i važan su pohrambeni oblik energije, a osim toga služe kao prekursori za sintezu staničnih membrana, sudjeluju u posttranslacijskim kovalentnim modifikacijama proteina i služe kao prekursori za sintezu nekih hormona i intracelularnih signalnih molekula. Lipolizom (hidrolizom esterskih veza između glicerola i masnih kiselina) se iz triacilglicerola oslobađaju masne kiseline i glicerol. Glicerol se fosforilira djelovanjem enzima *glicerol kinaze* uz utrošak ATP-a i zatim oksidira u dihidroksiacetonfosfat uz NAD^+ kao oksidans djelovanjem enzima *glicerol-fosfat dehidrogenaze*. Lipoliza i reakcije kojima se glicerol prevodi u dihidroksiacetonfosfat se odvijaju u citosolu. Dihidroksiacetonfosfat se dalje razgrađuje glikolizom.

Masne kiseline se razgrađuju procesom **β -oksidacije** koji se odvija u mitohondrijima. Transportu u mitohondrij prethodi aktivacija masnih kiselina u reakciji koju katalizira enzim *acil-CoA sintetaza*. Masne kiseline se aktiviraju u reakciji s ATP-om, pri čemu nastaje acil-CoA, PP_i i AMP. U matriksu mitohondrija se aktivirana masna kiselina razgrađuje ponavljanjem slijeda od četiri reakcije koje čine ciklus β -oksidacije: oksidacija (uz FAD), hidratacija, oksidacija (uz NAD^+) i tioliza.

U svakom krugu β -oksidacije kao produkti reakcije nastaju FADH_2 , NADH, acetil-CoA i aktivirana masna kiselina kraća za dva C-atoma. U zadnjem krugu β -oksidacije nastaju FADH_2 , NADH i dvije molekule acetil-CoA. Razgradnjom masne kiseline s neparnim brojem C-atoma u zadnjem krugu β -oksidacije nastaju kao produkti FADH_2 , NADH, acetil-CoA i propionil-CoA. Propionil-CoA se karboksilira na račun energije ATP-a reakcijom koju katalizira *propionil-CoA karboksilaza*. Nastali D-metilmalonil-CoA se racemizira u L-izomer kojeg *metilmalonil-CoA mutaza* intramolekulskom pregradnjom prevodi u sukcinil-CoA koji ulazi u citratni ciklus. Tijekom razgradnje nezasićenih masnih kiselina u krugu β -oksidacije u kojem na red dođe odgradnja dijela lanca u kojem se već nalazi dvostruka veza preskače se reakcija koju katalizira *acil-CoA dehidrogenaza*. Stoga se u tom krugu β -oksidacije ne dobije FADH_2 , već samo NADH i acetil-CoA. Masne kiseline dulje od 18C atoma počinju razgradnju u peroksisomima (odnosno glioksisomima kod biljaka), gdje se lanac aktivirane masne kiseline skraćuje dok se ne dosegne C18 (odnosno C17 za masne kiseline s neparnim brojem C atoma). FADH_2 koji nastaje u prvoj reakciji β -oksidacije u peroksisomima se oksidira molekulskim kisikom, pa se njegovom oksidacijom ne dobiva energija za sintezu ATP-a. NADH koji nastaje

β -oksidacijom u peroksisomima se oksidira pomoću glicerol-fosfatnog povratnog prijenosnika, pri čemu se dobije dovoljno energije za sintezu 1,5 ATP-a. Acetil-CoA koji nastane u peroksisomima se ne može transportirati u mitohondrij i uključiti u citratni ciklus već ostaje u citosolu i koristi se u biosintetskim reakcijama.

Za detaljniji prikaz reakcija razgradnje masnih kiselina upućuje se pogledati J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 621-630.

Primjeri zadataka – razgradnja masnih kiselina

1. primjer

Koliko će ATP nastati razgradnjom masne kiseline od 20 C atoma ako su produkti razgradnje miristil-CoA (C_{14}) i CO_2 ?

Rješenje:

Masna kiselina se prvo aktivira djelovanjem enzima acil-CoA sintetaze, pri čemu se troše dvije visokoenergetske veze (ATP se u reakciji cijepa na AMP i PP_i) – u energetske bilanci to računamo kao utrošak energije ekvivalentne hidrolizi 2 ATP-a (- 2 ATP).

Nakon aktivacije se acil-CoA transportira u peroksisome gdje se odvija jedan krug β -oksidacije da bi se lanac aktivirane masne kiseline skratio na 18 C atoma i mogao nakon toga transportirati u mitohondrij.

U jednom krugu razgradnje u peroksisomima nastaje 1 acetil-CoA koji ide u biosinteze (dakle iz njega se ne dobiva energija), zatim 1 $FADH_2$ u reakciji koju katalizira acil-CoA dehidrogenaza i 1 NADH u reakciji koju katalizira L-hidroksi acil-CoA dehidrogenaza. $FADH_2$ se oksidira molekulskim kisikom pa se energija oslobođena njegovom oksidacijom ne prevodi u ATP. Elektroni sa NADH se transportiraju u mitohondrij u proces oksidativne fosforilacije glicerol-fosfatnim povratnim prijenosnikom, pri čemu se dobije dovoljno energije za sintezu 1,5 ATP-a.

Slijede dva kruga razgradnje u mitohondriju pri čemu se dobiju 2 acetil-CoA, 2 $FADH_2$ (reakcija koju katalizira acil-CoA dehidrogenaza) i 2 NADH (reakcija koju katalizira L-hidroksi acil-CoA dehidrogenaza).

Oksidacijom tako dobivenih reduciranih koenzima dobije se energija ekvivalentna 8 ATP-a
 $\sum 2 FADH_2 + 2 NADH = 2 \times 1,5 + 2 \times 2,5 = 8 \text{ ATP}$

Ukupni dobitak energije je:

$$\sum -2\text{ATP}_{(\text{aktivacija masne kiseline})} + 1,5\text{ATP}_{(\text{u peroksisomima})} + 8\text{ATP}_{(\text{u mitohondriju})} = 7,5 \text{ ATP}$$

Dobiveni acetil-CoA se dalje razgrađuju u citratnom ciklusu:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--------------------------------|----------------------|-------------------|
| izocitrat dehidrogenaza | +2 NADH | = +5ATP |
| α-ketoglutarat dehidrogenaza | +2 NADH | = +5 ATP |
| sukcetil-CoA-sintetaza | | +2 GTP |
| sukcinat dehidrogenaza | +2 FADH ₂ | = +3 ATP |
| malat dehidrogenaza | +2 NADH | = + 5ATP |
| | | Σ+20 ATP |

Ukupno se potpunom razgradnjom 2 acetil-CoA u citratnom ciklusu i oksidacijom dobivenih reduciranih koenzima dobije 20 ATP-a.

Ukupni dobitak energije β-oksidacijom, citratnim ciklusom i oksidacijskom fosforilacijom:

$$\Sigma \Sigma 20 \text{ ATP} + 7,5 \text{ ATP} = 27,5 \text{ ATP}$$

2. primjer

Koliko će ATP nastati potpunom razgradnjom masne kiseline od 17 C atoma u stanicama u kojima je inaktivirana malat dehidrogenaza?

Rješenje:

Aktivacija masne kiseline u reakciji koju katalizira acil-CoA sintetaza: -2 ATP

U 7 krugova β-oksidacije u mitohondriju dobije se: 7 acetil-CoA i 1 propionil-CoA

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|----------------------------------|----------------------|-------------------|
| acil-CoA dehidrogenaza | +7 FADH ₂ | = +10,5 ATP |
| L-hidroksiacil-CoA dehidrogenaza | +7 NADH | = +17,5 ATP |
| | | Σ+28 ATP |

Energija dobivena na račun oksidacije koenzima iz β-oksidacije:

$$\Sigma 7 \text{ FADH}_2 + 7 \text{ NADH} = 7 \times 1,5 + 7 \times 2,5 = 28 \text{ ATP}$$

Ukupno energija dobivena razgradnjom masne kiseline do acetil-CoA i propionil-CoA:

$$\Sigma \Sigma -2 \text{ ATP (aktivacija masne kiseline)} + 28 \text{ ATP (}\beta\text{-oksidacija)} = 26 \text{ ATP}$$

Propionil-CoA je potrebno prvo karboksilirati i prevesti u sukcinil-CoA koji se zatim uključuje u citratni ciklus. Za karboksilaciju propionil-CoA troši se energija 1 ATP-a u reakciji koju katalizira propionil-CoA karboksilaza (-1 ATP).

U citratni ciklus ulaze 7 acetil-CoA i 1 sukcinil-CoA:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--------------------------------------|----------------------|-------------------|
| izocitrat dehidrogenaza | +7 NADH | = +17,5 ATP |
| α -ketoglutarat dehidrogenaza | +7 NADH | = +17,5 ATP |
| sukcinil-CoA-sintetaza | | +8 GTP |
| sukcinat dehidrogenaza | +8 FADH ₂ | = +12 |
| | | Σ + 55 ATP |

Ukupno se potpunom razgradnjom 7 acetil-CoA i 1 sukcinil-CoA u citratnom ciklusu i oksidacijom dobivenih reduciranih koenzima dobije 55 ATP-a.

Ukupni dobitak energije β -oksidacijom, citratnim ciklusom i oksidacijskom fosforilacijom:
 $\Sigma\Sigma$ 26 ATP (aktivacija i β -oksidacija) – 1 ATP (karboksilacija propionil-CoA) + 55 ATP (citratni ciklus) = 80 ATP

3. primjer

Koliko će se ATP-a ukupno dobiti razgradnjom 1 molekule triacilglicerola, koji sadrži 2 masne kiseline od 13 C-atoma i jednu od 16 C-atoma?

Rješenje:

Nakon lipolize glicerol se fosforilira i oksidira u dihidroksiaceton i zatim uključuje u glikolizu do piruvata. Dobiveni piruvat se oksidira i dekarboksilira u acetilnu jedinicu vezanu na CoA u reakciji koju katalizira kompleks piruvat dehidrogenaze. Acetil-CoA ide u citratni ciklus u kojem se acetilna jedinica razgrađuje do 2 CO₂.

Niz reakcija od glicerola do acetil-CoA:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--------------------------------------|--------------------------|-------------------|
| glicerol-kinaza | | -1 ATP |
| glicerol-fosfat dehidrogenaza | +1 NADH (citosolni) | = + 1,5 ATP |
| gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza | +1 NADH (citosolni) | = +1,5 ATP |
| fosfoglicerat kinaza | | +1 ATP |
| piruvat kinaza | | +1 ATP |
| piruvat dehidrogenaza | +1 NADH (mitohondrijski) | = +2,5 ATP |
| | | Σ +6,5 ATP |

Citosolni NADH se oksidira posredstvom glicerol-fosfatnog povratnog prijenosnika, pa se u procesu oksidacijske fosforilacije na njegov račun dobije po 1,5 ekvivalent ATP-a.

Acetil-CoA dalje ide u citratni ciklus:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--------------------------------------|----------------------|-------------------|
| izocitrat dehidrogenaza | +1 NADH | = +2,5 ATP |
| α -ketoglutarat dehidrogenaza | +1 NADH | = +2,5 ATP |
| sukcinil-CoA-sintetaza | | +1 GTP |
| sukcinat dehidrogenaza | +1 FADH ₂ | = +1,5 ATP |
| malat dehidrogenaza | +1 NADH | = +2,5 ATP |
| | | Σ +10 ATP |

Ukupno se potpunom razgradnjom acetil-CoA u citratnom ciklusu i oksidacijom dobivenih reduciranih koenzima dobije 10 ATP-a.

Ukupno energija dobivena razgradnjom glicerola:

$$\Sigma \Sigma 6,5 \text{ ATP} + 10 \text{ ATP} = 16,5 \text{ ATP}$$

Masna kiselina od 13 C atoma:

Aktivacija masne kiseline u reakciji koju katalizira acil-CoA sintetaza: -2 ATP

U 5 krugova β -oksidacije u mitohondriju dobije se: 5 acetil-CoA i 1 propionil-CoA

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|---------------------------------|----------------------|-------------------|
| acil-CoA dehidrogenaza | +5 FADH ₂ | = +7,5 ATP |
| L-hidroxiacil-CoA dehidrogenaza | +5 NADH | = +12,5 ATP |
| | | Σ +20 ATP |

Na račun energije oslobođene oksidacijom koenzima iz β -oksidacije dobije se ukupno 20 ATP.

Propionil-CoA je potrebno prvo karboksilirati i prevesti u sukcinil-CoA koji se zatim uključuje u citratni ciklus. Za karboksilaciju propionil-CoA se troši energija 1 ATP-a u reakciji koju katalizira propionil-CoA karboksilaza (-1 ATP).

U citratni ciklus ulaze 5 acetil-CoA i 1 sukcinil-CoA:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--------------------------------------|----------------------|-------------------|
| izocitrat dehidrogenaza | +5 NADH | = +12,5 ATP |
| α -ketoglutarat dehidrogenaza | +5 NADH | = +12,5 ATP |
| sukcinil-CoA-sintetaza | | +6 GTP |
| sukcinat dehidrogenaza | +6 FADH ₂ | = +9 ATP |
| malat dehidrogenaza | +6 NADH | = +15 ATP |
| | | Σ +55 ATP |

Ukupno se potpunom razgradnjom 5 acetil-CoA i 1 sukcinil-CoA u citratnom ciklusu i oksidacijom dobivenih reduciranih koenzima dobije 55 ATP-a.

Ukupno dobivena energija razgradnjom masne kiseline od 13 C atoma:

$$\Sigma\Sigma -2 \text{ ATP} + 20 \text{ ATP} - 1 \text{ ATP} + 55 \text{ ATP} = 72 \text{ ATP}$$

Masna kiselina od 16 C atoma:

Aktivacija masne kiseline u reakciji koju katalizira acil-CoA sintetaza: -2 ATP

U 7 krugova β -oksidacije u mitohondriju dobije se: 8 acetil-CoA

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|----------------------------------|----------------------|-------------------|
| acil-CoA dehidrogenaza | +7 FADH ₂ | = +10,5 ATP |
| L-hidroksiacil-CoA dehidrogenaza | +7 NADH | = +17,5 ATP |
| | | Σ +28 ATP |

Na račun energije oslobođene oksidacijom koenzima iz β -oksidacije dobije se ukupno 28 ATP.

U citratni ciklus ulazi 8 acetil-CoA:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--------------------------------------|----------------------|-------------------|
| izocitrat dehidrogenaza | +8 NADH | = +20 ATP |
| α -ketoglutarat dehidrogenaza | +8 NADH | = +20 ATP |
| sukcinil-CoA-sintetaza | | +8 GTP |
| sukcinat dehidrogenaza | +8 FADH ₂ | = +12 ATP |
| malat dehidrogenaza | +8 NADH | = +20 ATP |
| | | Σ +80 ATP |

Ukupno se potpunom razgradnjom 8 acetil-CoA u citratnom ciklusu i oksidacijom dobivenih reduciranih koenzima dobije 80 ATP-a.

Ukupno dobivena energija razgradnjom masne kiseline od 16 C atoma:

$$\sum \sum -2 \text{ ATP} + 28 \text{ ATP} + 80 \text{ ATP} = 106 \text{ ATP}$$

Ukupno dobivena energija razgradnjom glicerola, dvije masne kiseline od 13 C atoma i masne kiseline od 16 C atoma:

$$\sum \sum \sum 6,5 \text{ ATP} + 72 \text{ ATP} + 72 \text{ ATP} + 106 \text{ ATP} = 266,5 \text{ ATP}$$

16.2. Sinteza masnih kiselina

Proces sinteze masnih kiselina odvija se u staničnom citosolu u uvjetima kada stanica ima puno energije. Prekursori za sintezu masnih kiselina su acetilne jedinice koje se iz mitohondrija u citosol prenose u formi citrata. Citrat se u citosolu djelovanjem enzima ***citrat liaze*** cijepa na acetil-CoA i oksaloacetat uz utrošak jedne molekule ATP-a. Sinteza masnih kiselina započinje karboksilacijom acetil-CoA u malonil-CoA (odlučujući korak u sintezi masnih kiselina). Reakciju katalizira ***acetil-CoA karboksilaza*** koja sadrži prostetsku skupinu biotin.

Sintezu zasićenih masnih kiselina katalizira multienzimski kompleks koji se naziva ***sintaza masnih kiselina***. Reakciju prijenosa aktivirane acetilne jedinice (odnosno propionilne jedinice za sintezu masnih kiselina s neparnim brojem C atoma) s CoA na ACP katalizira enzim ***acetil-transacilaza***, a malonilne jedinica ***malonil-transacilaza***. Prva reakcija sinteze masnih kiselina je kondenzacija acetil-ACP i malonil-ACP uz dekarboksilaciju. Slijedi redukcija, dehidracija i ponovna redukcija – ovaj niz reakcija se ponavlja dok se ne dosegne konačna duljina molekule masne kiseline (najviše 16 C atoma).

Za detaljniji prikaz reakcija sinteze masnih kiselina upućuje se pogledati J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 634 - 639.

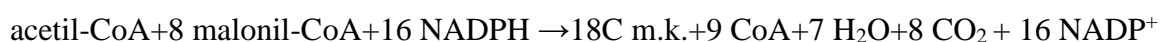
Primjeri zadataka – sinteza masnih kiselina

1. primjer

Definirajte niz reakcija kojima će se u stanicama kvasca od glicerola doći do malonil-CoA te izračunajte ukupni broj molekula ATP-a koji će se dobiti ili potrošiti u ovim reakcijama da bi se dobio potreban broj molekula malonil-CoA za sintezu masne kiseline (m.k.) od 18 C atoma.

Rješenje:

Zbirna jednadžba sinteze masne kiseline od 18C atoma glasi:



Budući da je za sintezu potrebno 8 malonil-CoA, 8 molekula glicerola treba prvo prevesti u 8 acetil-CoA, pri čemu se energija dobiva / troši u sljedećim reakcijama:

| Reakcija katalizirana enzimom: | reducirani koenzimi | ekvivalenti ATP-a |
|--------------------------------------|--------------------------|-------------------|
| glicerol kinaza | | - 8 ATP |
| glicerol-fosfat dehidrogenaza | +8 NADH (citosolni) | = +12 ATP |
| gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza | +8 NADH (citosolni) | = +12 ATP |
| fosfoglicerat kinaza | | +8 ATP |
| piruvat kinaza | | +8 ATP |
| piruvat dehidrogenaza | +8 NADH (mitohondrijski) | = + 20 ATP |
| | | Σ+ 52 ATP |

Ukupno dobivena energija od glicerola do acetil-CoA iznosi 52 ekvivalenta ATP-a.

Dalje se 8 acetil-CoA transportira iz mitohondrija u citosol i karboksilira u malonil-CoA pri čemu se energija troši u reakcijama koje kataliziraju enzimi citrat liaza (-8 ATP) i acetil-CoA karboksilaza (- 8 ATP).

Ukupno dobivena energija u nizu reakcija od 8 glicerola do 8 malonil-CoA:

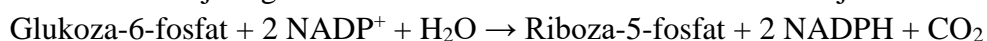
$$\Sigma + 52 \text{ ATP} - 8 \text{ ATP} - 8 \text{ ATP} = + 36 \text{ ATP}$$

2. primjer

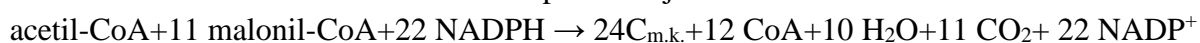
Koliko molekula glukoze-6-fosfata se mora dekarboksilirati do riboze-5-fosfata da bi se dobio NADPH potreban za sintezu masne kiseline od 24 C atoma, ako se **sav** NADPH osigurava reakcijama puta pentoza-fosfata (inaktivan je malatni enzim)?

Rješenje:

Dekarboksilacijom glukoze-6-fosfata do riboze-5-fosfata se dobije 2 NADPH:



Za sintezu masne kiseline od 24 C atoma potrebno je 22 NADPH:



Omjer dobivenog i potrebnog NADPH iznosi: $\frac{22}{2} = 11$

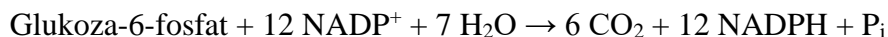
Da bi se dobio NADPH potreban za sintezu masne kiseline od 24C atoma, ako se **sav** NADPH osigurava reakcijama puta pentoza-fosfata, potrebno je dekarboksilirati 11 molekula glukoze-6-fosfata do riboze-5-fosfata.

3. primjer

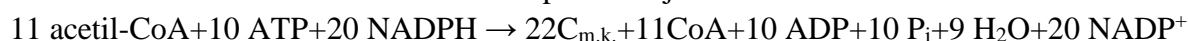
Koliko se molekula glukoze-6-fosfata mora potpuno razgraditi da bi se dobio NADPH potreban za sintezu masne kiseline od 22 C atoma, ako se **sav** NADPH osigurava reakcijama puta pentoza-fosfata (inaktivan je malatni enzim)?

Rješenje:

Potpunom razgradnjom glukoze-6-fosfata putem pentoza-fosfata dobije se 12 NADPH.



Za sintezu masne kiseline od 22 C atoma potrebno je 20 NADPH:



Omjer dobivenog i potrebnog NADPH iznosi: $\frac{20}{12} = 1,67$

Da bi se dobio NADPH potreban za sintezu masne kiseline od 22C atoma, ako se sav NADPH osigurava reakcijama puta pentoza-fosfata, potrebno je potpuno razgraditi 2 molekule glukoze-6-fosfata reakcijama puta pentoza-fosfata.

4. primjer

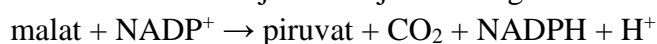
Koliko molekula glukoze-6-fosfata se mora dekarboksilirati do riboze-5-fosfata da bi se dobio NADPH potreban za sintezu masne kiseline od 12 C atoma u: 1. stanicama divljeg tipa; 2. stanicama u kojima je inaktivan malatni enzim?

Rješenje:

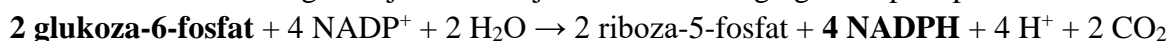
Za sintezu masne kiseline od 12 C atoma potrebno je 10 NADPH:



1. **6 NADPH** dobiva se pri prijenosu 6 acetil-CoA iz mitohondrija u citosol i vraćanju oksaloacetata u mitohondrij u reakciji malatnog enzima:

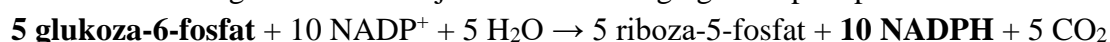


Preostala 4 NADPH osiguravaju se reakcijama oksidativnog ogranka puta pentoza-fosfata:



Potrebno je dekarboksilirati dvije molekule glukoze-6-fosfata.

2. **Sav** NADPH osigurava se reakcijama oksidativnog ogranka puta pentoza-fosfata:



Potrebno je dekarboksilirati 6 molekula glukoza-6-fosfata.

Zadatci za vježbu – metabolizam masnih kiselina

1. Napišite strukturnim formulama (osim koenzima) i kemijski definirajte sve reakcije koje se odvijaju na kompleksu sintaze masnih kiselina.
2. Navedite sve enzime koji kataliziraju reakcije i kemijski definirajte sve reakcije β -oksidacije masnih kiselina.
3. Napišite strukturnim formulama (osim koenzima) niz reakcija kojima se acetyl-CoA iz mitohondrija prevodi do malonil-CoA tijekom sinteze masnih kiselina.
4. Navedite u kojim se uvjetima i u kojim staničnim odjeljcima odvija sinteza masnih kiselina te nabrojite sve supstrate i kosupstrate tog metaboličkog puta.
5. Napišite zbirnu jednadžbu β -oksidacije aktivirane masne kiseline od 14C atoma.
6. Razvrstajte koje se od sljedećih reakcija odvijaju u procesu razgradnje, a koje u procesu sinteze masnih kiselina te ih poredajte prema redoslijedu kojim se odvijaju u jednom, odnosno drugom procesu:
 - a) oksidacija uz NAD^+ ,
 - b) kondenzacija acetilne i malonilne jedinice,
 - c) aktivacija masnih kiselina,
 - d) tioliza,
 - e) vezanje masne kiseline na karnitin,
 - f) hidratacija,
 - g) vezanje acilnih grupa na kompleks sintaze masnih kiselina,
 - h) redukcija dvostruke veze,
 - i) nastajanje dvostruke veze uz uklanjanje molekule vode,
 - j) oksidacija uz FAD,
 - k) redukcija karbonilne grupe acetoacil-ACP-a.
7. Napišite zbirnu jednadžbu sinteze masne kiseline od 16 C atoma počevši od fosfoenolpiruvata kao prekursora.
8. Napišite zbirnu jednadžbu sinteze masne kiseline od 15 C atoma, počevši od acilnih prekursora u citosolu i izračunajte koliko molekula glukoze-6-fosfata se mora razgraditi do CO_2 da bi se osigurao sav NADPH potreban za sintezu te masne kiseline.
9. Izračunajte koliko će se kJ energije dobiti potpunom razgradnjom 500 mg mononezasićene masne kiseline od 15C atoma ($M = 240,4 \text{ g/mol}$) u stanicama u kojima je inaktivna malat dehidrogenaza (ΔG^0 hidrolize ATP-a je $-30,5 \text{ kJ/mol}$).

10. Izračunajte koliko će se energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) dobiti razgradnjom diacil-glicerola koji sadrži masnu kiselinu od 13C atoma i masnu kiselinu od 21C atoma u stanicama u kojima je inaktivna fumaraza.
11. Izračunajte koliko će se energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) dobiti razgradnjom diacil-glicerola koji sadrži masnu kiselinu prikazanu formulom $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ i zasićenu masnu kiselinu od 21C atoma u stanicama u kojima je inaktivna metil-malonil-CoA mutaza.
12. Izračunajte koliko će se energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) dobiti potpunom razgradnjom (do CO_2 i H_2O) masne kiseline prikazane formulom $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$.
13. Izračunajte koliko će se energije (izraženo u kJ) dobiti potpunom razgradnjom (do CO_2 i H_2O) 2 g masne kiseline prikazane formulom $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$. ($M_r = 338,58$; $\Delta G^0_{\text{ATP}} = -30,5 \text{ kJ/mol}$).
14. Napišite zbirnu jednadžbu i energetske bilancu razgradnje linolne kiseline (C18:2) u stanicama u kojima je inaktivirana α -ketoglutarat dehidrogenaza.
15. Koliko grama trioleilglicerida (oleinska kiselina C18:1) je potrebno stanici za oslobađanje 200 kJ energije (ΔG^0 hidrolize ATP-a = -30,5 kJ/mol) ako je u stanici mutiran gen za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu, a iskorištenje na energiji je 30 %?
16. Napišite zbirnu jednadžbu sinteze laurinske kiseline (12:0) ako sinteza počinje od fruktoze kao prekursora te izračunajte koliko će se mL CO_2 osloboditi tijekom sinteze 10 mg ove masne kiseline (M_r laurinske kiseline = 200,32).
17. Napišite potpunu energetske bilancu (utrošenih i dobivenih ekvivalenata ATP-a) potpune razgradnje trilinolenilglicerata (C18:3).
18. Napišite zbirnu jednadžbu pretvorbe masne kiseline od 17 C atoma u odgovarajući broj molekula acetoacetata i izračunajte energetske bilansu ovog niza reakcija (izraženo ekvivalentima ATP-a).
19. Izračunajte koliko će se energije (izraženo brojem molekula ATP-a) dobiti razgradnjom masne kiseline od 15 C atoma koja sadrži dvije nezasićene veze u stanicama u kojima je inaktivna sukcinil-CoA sintaza.
20. Izračunajte i objasnite koliko će se kJ energije dobiti potpunom razgradnjom 500 mg mononezasićene masne kiseline od 15 C atoma ($M = 240,40 \text{ g mol}^{-1}$) u stanicama u kojima je inaktivna α -ketoglutarat dehidrogenaza (ΔG^0 hidrolize ATP = -30,5 kJ/mol).

21. Izračunajte koliko će se energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) dobiti potpunom razgradnjom diacil-glicerola koji sadrži jednu mononezasićenu masnu kiselinu od 21C atoma i jednu masnu kiselinu od 15C atoma u stanicama u kojima je inaktivna propionil-CoA karboksilaza.
22. Izračunajte koliko bi C atoma trebala sadržavati masna kiselina čijom bi se razgradnjom dobilo dovoljno acetyl-CoA da bi se iz njih u biljnim stanicama moglo sintetizirati 3 molekule glukoze. Definirajte niz reakcija i napišite zbirnu jednadžbu sinteze glukoze iz acetyl-nih jedinica.
23. Napišite niz reakcija kojima će se od fosfoenolpiruvata u citosolu doći do acetyl-CoA u citosolu te izračunajte koliko će se energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) dobiti ili potrošiti u ovim reakcijama.
24. Napišite energetska bilancu iskorištavanja glicerola kao jedinog izvora ugljika u stanicama u kojima je mutiran gen za transporter tiamina, a ne mogu same sintetizirati taj kofaktor.
25. Izračunajte koliko se energije dobije potpunom razgradnjom 10 mg acetoacetata ($M_{\text{acetoacetata}} = 102,09$; $\Delta G^0_{\text{ATP}} = -30,5 \text{ kJ/mol}$).

17. METABOLIZAM AMINOKISELINA I UREA CIKLUS

Razgradnja aminokiselina započinje uklanjanjem α -amino skupine reakcijom transaminacije, tako da se amino skupina prebaci na neku α -ketokiselinu djelovanjem enzima *transaminaza*. U većini slučajeva akceptor amino skupine je α -ketoglutarat, koji se tako prevodi u glutamat. Enzim koji katalizira ovu reakciju je *glutamat transaminaza*. Glutamat nastao transaminacijom se zatim oksidacijski deaminira, pri čemu se oslobađa NH_4^+ ion i regenerira α -ketoglutarat u reakciji koju katalizira *glutamat dehidrogenaza* uz koenzim NAD^+ .

Ugljikove okosnice deaminiranih glukogenih aminokiselina prevode se u piruvat i međuprodukte ciklusa limunske kiseline, a ketogenih aminokiselina u acetil-CoA i acetoacetat. Oslobodeni amonijevi ioni ugrađuju se u biomolekule. Donori dušika u biosintezi velikog broja različitih spojeva s dušikom su glutamat i glutamin. Reakciju sinteze glutamina iz glutamata i amonijeva iona katalizira *glutamin sintetaza*, a potrebna energija se osigurava cijepanjem ATP-a.

Višak amonijevih iona se izlučuje u obliku uree. Reakcijama sinteze uree (urea ciklus) prethodi ugradnja NH_4^+ u karbamoil-fosfat, u reakciji koju katalizira *karbamoil-fosfat sintetaza*, a odvija se u mitohondriju. Prva reakcija urea ciklusa, kondenzacija ornitina i karbamoil-fosfata, odvija se također u mitohondriju, a sve ostale reakcije: kondenzacija citrulina i aspartata, cijepanje nastalog argininosukcinata na arginin i fumarat te cijepanje arginina na ureu i ornitin, odvijaju se u citosolu.

Za detaljniji prikaz reakcija razgradnje aminokiselina i urea ciklusa upućuje se pogledati J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 656-666.

Primjeri zadataka – metabolizam aminokiselina i urea ciklus

1. primjer

Izračunajte koliko će se energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) dobiti ili potrošiti u ovom nizu reakcija: piruvat \rightarrow citrat \rightarrow glutamin. Napišite sve reakcije te objasnite račun.

Rješenje:

| Reakcija | Enzim | Energija |
|---|-------------------------|----------|
| $\text{piruvat} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{acetil-CoA} + \text{NADH} + \text{H}^+ + \text{CO}_2$ | piruvat dehidrogenaza | +1 NADH |
| $\text{acetil-CoA} + \text{oksalooacetat} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{citrat} + \text{CoA} + \text{H}^+$ | citrat sintaza | |
| citrat \rightarrow izocitrat | akonitaza | |
| $\text{izocitrat} + \text{NAD}^+ \rightarrow \alpha\text{-ketoglutarat} + \text{NADH} + \text{CO}_2$ | izocitrat dehidrogenaza | +1 NADH |
| $\alpha\text{-ketoglutarat} + \text{NH}_4^+ + \text{H}^+ + \text{NADPH} \rightarrow \text{glutamat} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}^+$ | glutamat dehidrogenaza | |
| $\text{glutamat} + \text{NH}_4^+ + \text{ATP} \rightarrow \text{glutamin} + \text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^+$ | glutamin sintetaza | -1 ATP |
| $\Sigma 2\text{NADH} - 1\text{ATP} = 2 \times 2,5 - 1 = 4\text{ATP}$ | | |

Ukupni dobitak energije u ovom nizu reakcija iznosi 4 ekvivalenta ATP-a. Ovim nizom reakcija dobiju se dva mitohondrijska NADH koji oksidacijom u respiratornom lancu daju dovoljno energije za sintezu ukupno 5 ATP-a. Jedan ATP se troši za vezanje amino skupine na glutamat, a NADPH koji se troši u reakciji redukcije α -ketoglutarata nije ekvivalent energije ATP-a jer se ne oksidira u oksidacijskoj fosforilaciji.

2. primjer

Definirajte niz reakcija kojima bi polazeći od NH_4^+ , CO_2 , piruvata, glutamata i potrebnih koenzima mogli dobiti molekulu uree i izračunajte koliko se ukupno ukupno energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) dobije ili potroši u tom nizu reakcija.

Rješenje:

| Reakcija | Enzim | Energija |
|--|----------------------------|----------|
| $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{ATP} + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{karbamoil-fosfat} + 2\text{ADP}$ | karbamoil-fosfat sintetaza | -2 ATP |
| karbamoil-fosfat + ornitin \rightarrow citrulin | ornitin transkarbamoilaza | |
| $\text{piruvat} + \text{ATP} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{okasaloacetat} + \text{ADP} + \text{P}_i$ | piruvat karboksilaza | -1 ATP |
| oksalooacetat + glutamat \rightarrow aspartat + α -ketoglutarat | aspartat transaminaza | |
| citrulin + aspartat + ATP \rightarrow argininosukcinat + AMP + PP_i | arginosukcinat sintetaza | -2 ATP |
| argininosukcinat \rightarrow arginin + fumarat | argininosukcinaza | |
| arginin + $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ ornitin + urea | arginaza | |
| $\Sigma -2 + -1 + -2 = -5\text{ATP}$ | | |

Ukupno se ovim nizom reakcija potroši 5 ekvivalenata ATP-a.

3. primjer

Definirajte niz reakcija kojima bi polazeći od malata, glutamata, karbamoil-fosfata i potrebnih koenzima mogli dobiti molekulu uree i izračunajte ukupni dobitak ili utrošak energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) u tom nizu reakcija.

Rješenje:

| Reakcija | Enzim | Energija |
|---|---------------------------|----------|
| malat + NAD ⁺ → oksaloacetat + NADH | malat dehidrogenaza | +1 NADH |
| oksalacetat+ glutamat → aspartat + α-ketoglutarat | aspartat transaminaza | |
| karbamoil-fosfat + ornitin → citrulin | ornitin transkarbamoilaza | |
| citrulin+aspartat+ATP→ argininosukcinat+ AMP+ PP _i | arginosukcinat sintetaza | -2 ATP |
| argininosukcinat → arginin + fumarat | argininosukcinaza | |
| arginin + H ₂ O → ornitin + urea | arginaza | |
| Σ + 2,5 ATP – 2 ATP = + 0,5 ATP | | |

Ukupni dobitak energije je 0,5 ekvivalenata ATP-a.

Zadatci za vježbu – metabolizam aminokiselina i urea ciklus

1. Napišite i objasnite zbirnu jednadžbu urea ciklusa u stanicama u kojima je inaktivirana arginaza počevši od CO_2 i NH_4^+ .
2. Napišite zbirnu jednadžbu urea ciklusa uključujući regeneraciju aspartata.
3. Definirajte niz reakcija kojima se polazeći od glutamata, CO_2 , ATP-a, ornitina i aspartata može sintetizirati urea te izračunajte koliko bi se energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) dobilo ili potrošilo u tom nizu reakcija.
4. Napišite i objasnite zbirnu jednadžbu niza reakcija kojima se polazeći od dva alanina, dva CO_2 , α -ketoglutarata, ornitina i odgovarajućeg broja ATP-a može sintetizirati urea.
5. Napišite i objasnite zbirnu jednadžbu urea ciklusa počevši od karbamoil-fosfata, malata i ATP-a u stanicama u kojima je inaktivirana arginaza.
6. Izračunajte koliko se molova serina može sintetizirati iz 3 g glukoze (M_r glukoze = 180)?
7. Definirajte niz reakcija kojima se polazeći od 3 molekule glutamata, 1 molekule malata, 1 molekule CO_2 , odgovarajućeg broja NH_4^+ iona i potrebnih koenzima može sintetizirati arginin i glutamin. Odgovorite koliko će ukupno molekula glutamina i arginina nastati te koliko će se NH_4^+ iona potrošiti u tom nizu reakcija.
8. Definirajte niz reakcija kojima bi polazeći od NH_4^+ , CO_2 , glutamata, 2-fosfoglicerata i potrebnih koenzima mogli dobiti asparagin. Izračunajte koliko bi se energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) dobilo ili potrošilo tim nizom reakcija.
9. Izračunajte i objasnite je li energija koja se dobije potpunom razgradnjom glutamata dovoljna za uklanjanje tako nastalog amonijaka?
10. Napišite niz reakcija kojima bi iz piruvata i odgovarajuće aminokiseline mogli dobiti glutamin uz regeneraciju piruvata. Izračunajte koliko bi se energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) dobilo ili potrošilo u tom nizu reakcija.
11. Napišite niz reakcija kojima bi, u stanicama u kojima je inaktivna glutamat transaminaza, polazeći od alanina i oksaloacetata uz suvišak amonijevih iona, mogli dobiti glutamin. Izračunajte koliko bi se energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) dobilo ili potrošilo u tom nizu reakcija.
12. Definirajte niz reakcija kojima bi u stanicama u kojima je inaktivna glutamat transaminaza polazeći od NH_4^+ , gliceraldehid-3-fosfata i oksaloacetata mogli dobiti supstrat za reakciju koju katalizira glutamin sintetaza. Izračunajte koliko bi se energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) dobilo ili potrošilo u tom nizu reakcija.

13. Izračunajte koliko bi se energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) dobilo ili potrošilo u nizu reakcija kojima bi u stanicama u kojima je inaktivna glutamat transaminaza polazeći od NH_4^+ , piruvata i aspartata pri povišenoj koncentraciji NADPH mogli dobiti supstrat za reakciju sinteze glutamina.

14. Izračunajte koliko će se energije (izraženo brojem ekvivalenata ATP-a) dobiti ili potrošiti u nizu reakcija kojima će se od fosfoenolpiruvata u citosolu doći do acetyl-CoA u citosolu.

18. RJEŠENJA ZADATAKA ZA VJEŽBU

Zadatci za vježbu – disocijacija aminokiselinskih grupa i neto naboj molekula

1. 99 %
2. 5,94 %
3. 96,9 %
4. 33,3 %
5. $2 < \text{pH} < 9,5$
6. $4 < \text{pH} < 9,5$
7. $\text{pI} = 8,15$
8. $\text{pI} = 5,4$
9. $9,5 < \text{pH} < 10,5$
10. +2
11. a) 5 Arg jer je pri $\text{pH} = 10,5$ 99 % Arg protonirano; b) Pir $\text{pH}=11,5$ samo 10% Lys ima naboj (1+); 90 % Arg je protonirano, a 10 % je već disocirano pa je potrebno 10 Arg da se dobije izoelektrični oblik pri $\text{pH} = 11,5$.
12. 16 His jer je pri $\text{pH} 6,8$ 50 % His disocirano, pa treba 16 His da bi dobili +8 naboja
13. 19 Lys
14. 20 Arg
15. Sadrži negativno nabijene aminokiseline (Asp, Glu), a ne sadrži pozitivno nabijene aminokiseline.
16. d) i e)
17. a) 50 % molekula će imati naboj +1, a 50 % naboj +2; b) 0; c) -2
18. $9,5 < \text{pH} < 12,5$
19. $\text{pI} = 8,15$; $2 < \text{pH} < 4$
20. $2 < \text{pH} < 4$

Zadatci za vježbu – titracijske krivulje

1. $\text{pI} = 7,75$
2. $\text{pI} = 11$
3. $\text{pI} = 11$
4. $\text{pI} = 6,75$; 1,5 mol OH^- /1mol tripeptida; $n(\text{tripeptida}) = 0,15$ mmol; $n(\text{OH}^-) = 0,225$ mmol;
 $V(\text{NaOH}) = 2,25$ mL
5. 37,5 mL
6. 3,125 mL
7. 225 mL
8. 126 mL
9. 54 mL
10. prevladavat će oblik neto naboja +1

Zadatci za vježbu – puferi

1. $m(\text{K}_2\text{HPO}_4) = 37,236$ g; $m(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 4,896$ g

2. 14,06 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$
3. 18,95 mL
4. 8,41 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$
5. $m(\text{NaAc}) = 0,738 \text{ g}$; $V(\text{HAc}) = 5,2 \text{ mL}$
6. $V(\text{Ca}(\text{OH})_2) = 113,75 \text{ mL}$
7. $V(\text{H}_2\text{SO}_4) = 9,5 \text{ mL}$
8. $V(\text{KOH}) = 12,26 \text{ mL}$
9. $m(\text{NaOH}) = 15,2 \text{ g}$
10. $m(\text{Gly}) = 1,5 \text{ g}$; $V(36 \% \text{ HCl}) = 0,233 \text{ mL}$

Zadatci za vježbu – struktura proteina

1. a) može; b) ne može (puno uzastopnih negativnih naboja); c) ne može (sadrži Pro)
2. Pobočni ogranci ovih dviju aminokiselina povezani će se ionskom vezom. Ova veza sudjeluje u uspostavljanju tercijarne i kvaterne strukture. Na interakciju s argininom najviše će utjecati zamjena s a) lizinom jer će se u proteinu na mjestu gdje je trebala biti negativno nabijena skupina naći pozitivno nabijena skupina koja će se odbijati s argininskom pobočnom skupinom. Najmanje će djelovati zamjena s c) aspartatom jer se u tom slučaju zamijenila s također negativno nabijenim ostatkom koji je samo za jednu CH_2 skupinu dulji. Serin ima nenabijenu polarnu skupinu u pobočnom ogranku pa neće moći stvarati ionsku vezu s argininom, ali neće niti uzrokovati elektrostatska odbijanja kao što će svojom pozitivno nabijenom skupinom lizin.
3. Disulfidni most je najjača veza u stabilizaciji tercijarne strukture, nastaje oksidacijom i povezivanjem dviju -SH skupina. Sljedeća je po jakosti ionska veza koja nastaje između dvije suprotno nabijene grupe koje se nalaze na odgovarajućoj udaljenosti. Slijedi vodikova veza koja nastaje između dvije polarne skupine od kojih je jedna donor vodikovog atoma u vodikovoj vezi, a druga njegov akceptor. Još slabije su hidrofobne interakcije koje nastaju okupljanjem nepolarnih ostataka u što manjem volumenu da bi se povećala entropija sustava, a najslabije su Van der Waalsove interakcije koje nastaju uslijed elektrostatskog privlačenja momentalnih dipola u atomima koji se nalaze unutar Van der Waalsovog radijusa.
4. a) Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Ala, Pro, ; b) Trp, Arg, Ser, Asn, Gln, Thr, His, Lys, Asp, Glu, Tyr; c) Lys, Arg, His, Asp, Glu
5. Vodikove veze sa pobočnim ogrankom Arg mogu stvarati npr. Ser, Thr, Gln, Asn; a ionske veze Glu i Asp.

Zadatci za vježbu – topljivost proteina

1. Netočne su tvrdnje: 1 – topljivost se smanjuje slabljenjem protein-otapalo interakcija i jačanjem protein-protein interakcija; 3 – tada su protein-protein interakcije najjače; 4 – podjednak je efekt na topljivost; 6 – svi proteini imaju veću topljivost uz dodatak ograničene koncentracije soli nego u čistoj vodi.

2. a) $pI_A = 4,1$; $pI_B = 5,8$ – kod tih točaka je najmanja topljivost; b) peptid B je hidrofobniji pa će trebati manje zasićenje sa soli da bi se postigla maksimalna topljivost odnosno taloženje.
3. Globulini će imati manju topljivost i taložiti će se kod nižeg zasićenja otopine amonijevim sulfatom.
4. Ima 4 cisteina.
5. Protein B ima značajno manji udio nepolarnih aminokiselina pa će biti topljiviji i taložiti će se dodatkom veće koncentracije soli.

Zadatci za vježbu – enzimska kinetika

1. broj obrtaja iznosi $46296,25 \text{ min}^{-1}$
2. $v = 800 \text{ } \mu\text{mol/min}$
3. $\text{pH} < 6,7$ i $\text{pH} > 10,58$
4. broj obrtaja iznosi $14881,25 \text{ min}^{-1}$; $S_a = 133,33 \text{ } \mu\text{mol/min mg}$
5. broj obrtaja iznosi 5988 min^{-1} ; $S_a = 40 \text{ IU/mg}$
6. $S_a = 50 \text{ IU/mg}$; broj obrtaja iznosi 31250 min^{-1}
7. Veći afinitet pokazuje prema supstratu A.
8. $7,5 \times 10^{-9} \text{ katal/mL}$
9. $V_{\text{max}} = 10 \text{ mmol/min}$; $K_m = 0,29 \text{ mM}$; broj obrtaja iznosi $1 \times 10^7 \text{ min}^{-1}$
10. $0,7 \text{ mM}$
11. 45 IU
12. A negativna kooperativnost; B pozitivna kooperativnost; C Michaelis-Menten kinetika
13. 1. netočno – v uvijek ovisi o koncentraciji S; 2. točno; 3. točno; 4. netočno - K_m ne ovisi o koncentraciji enzima; 5. netočno – K_m ne ovisi o koncentraciji enzima; 6. točno
14. $V = 96 \text{ } \mu\text{L}$
15. $[E] = 40 \text{ } \mu\text{M}$

Zadatci za vježbu – tipovi inhibicije

1. $[I] = 10,08 \text{ mM}$
2. a) $V_{\text{max}}' = 50 \% V_{\text{max}}$; b) $V_{\text{max}}' = 75 \% V_{\text{max}}$; c) $V_{\text{max}}' = 0 \% V_{\text{max}}$
3. $[I] = 660 \text{ mM}$
4. $V(I) = 2,8 \text{ mL}$
5. $v = 600 \text{ } \mu\text{mol/min}$
6. 25%
7. Manje od $44,55 \text{ mM}$
8. $170 \text{ } \mu\text{mol/min}$
9. Radi se o konkurentnoj inhibiciji, inhibitor se veže sa enzimom.
10. Parcijalno konkurentni inhibitor je B – V_{max} je ostala ista, a K_m se povećao.

Zadatci za vježbu – pročišćavanje proteina

1. (A i D) bismo odvojili od (B, C i E) gel-filtracijom. Zatim bismo A od D odvojili ionskom izmjenom. B, C i E bismo odvojili ionskom izmjenom.

2. a) vezat će se Pro-His-Leu i Arg-Lys-Glu; b) do elucije će doći povišenjem pH; c) eluirat će se prvo Pro-His-Leu, a zatim Arg-Lys-Glu
3. Prvi se eluira C pa zatim A.
4. 2,13 mg
5. aktivnost iznosi 85 IU/mL; $S_a = 850$ IU/mL
6. Ima 8 His.
7. $m = 0,224$ mg pepsina; $S_a = 8,33 \times 10^{-5}$ katal/mg
8. 0,0247 mol/sg
9. $1,06 \times 10^{-3}$ mola
10. $S_p = 4,67$

Zadatci za vježbu – replikacija, transkripcija i translacija

1. $5,15 \times 10^{-5}$ g
2. Broj visokoenergetskih veza za 1 protein = 3087; $n_{(\text{proteina})} = 1,17 \times 10^{-11}$ mola; utrošeno energije $1,1 \times 10^{-6}$ kJ
3. Točne su tvrdnje a, f i g.
4. Točne su tvrdnje 2, 4 i 6.
5. GCU
6. 2056 različitih proteina
7. Točne su tvrdnje 3, 4, 5 i 7.
8. a) $1,02 \times 10^6$; b) $3,4 \times 10^6$
9. 227 ATP, 907vev (454 iz ATP i 453 iz GTP)
10. 33000 g/mol
11. Met-Asp-Leu-His-Trp; kodirajući lanac je 5' CTTGGAATATGGACCTTCACTGG 3'
12. 1. umjesto kodona za Trp dobio bi se STOP kodon, pa bi M_r bila 17930; 2. umjesto Trp ugradit će se Ser, M_r će ostati 24500 jer imamo isti broj aminokiselina.
13. 0,046 mg
14. 0,0046 g
15. $7,25 \times 10^9$ GTP-a i $1,451 \times 10^{10}$ visokoenergetskih veza

Zadatci za vježbu – ΔG^0 u enzimskim reakcijama

1. Netočne su tvrdnje: a) ako je ΔG^0 negativan, reakcija je spontana, ΔG^0 ne pokazuje egzotermnost ili endotermnost reakcije; d) ukupna ΔG^0 u nizu reakcija je jednaka zbroju, a ne razlici ΔG^0 pojedinih reakcija; f) ΔG^0 ne pokazuje kojom se brzinom odvija reakcija i g) ΔG^0 ovisi o koncentracijama produkata i reaktanata i reakcijskim uvjetima, a ne o putu odvijanja reakcije.
2. Koncentracija fruktoza-6-fosfata mora biti manja od 0,72 mM jer je pri toj koncentraciji fruktoza-6-fosfata reakcija u ravnoteži.
3. Koncentracija glukoza-6-fosfata mora biti veća od 0,982 mM jer je pri toj koncentraciji glukoza-6-fosfata reakcija u ravnoteži.

4. U ravnoteži je koncentracija 3-fosfoglicerata 8,34 mM što znači da se reakcija odvija u smjeru prema 2-fosfogliceratu kada je koncentracija 3-fosfoglicerata veća od 8,43 mM.
5. ΔG^0 reakcije pretvorbe 2-fosfoglicerata u 3-fosfoglicerat je -4,6 kJ/mol
6. $\Delta G^0 = 3,81$ kJ/mol; $\Delta G = -24,71$ kJ/mol. Reakcija je spontana jer je ΔG negativan.
7. 49,3 kJ/mol
8. Koncentracija gliceraldehid-3-fosfata mora biti manja od 0,132 mM.
9. Koncentracija dihidroksiacetonfosfata mora biti veća od 0,026 M.
10. $\Delta G^0 = -3,8$ kJ/mol
11. $\Delta G^0 = 29,7$ kJ/mol
12. $\Delta G^0 = -360$ kJ/mol

Zadatci za vježbu – redoks-potencijal i promjena slobodne energije

1. Ako je akceptor fumarat $\Delta G^0 = -48,24$ kJ/mol, a ako je akceptor kisik $\Delta G^0 = -200,69$ kJ/mol. Više energije se oslobodi kada je akceptor kisik.
2. Ako je akceptor acetaldehid $\Delta G^0 = -23,15$ kJ/mol, a ako je akceptor α -ketoglutarat $\Delta G^0 = 67,54$ kJ/mol. Više se energije oslobodi kada je akceptor acetaldehid.
3. $\Delta G^0 = 23,15$ kJ/mol; $K' = 8,26 \times 10^{-5}$
4. $\Delta E_0' = 0,52$ V, $\Delta G^0 = -100,35$ kJ/mol
5. $K' = 8,26 \times 10^{-5}$
6. $\Delta E_0' \text{ NAD}^+/\text{NADH} = -0,32$ V
7. 16 elektrona
8. $\Delta E_0' \text{ NAD}^+/\text{NADH} = -0,32$ V ; $K = 3,8 \times 10^{-5}$
9. 14 elektrona

Zadatci za vježbu – glikoliza

1. a) N – ima fosfataznu aktivnost, supstrat je šećer; b) T; c) N – koristi kao supstrat fruktozu-6-fosfat; d) N – aktivnost se regulira reverzibilnom kovalentnom preinakom; e) N – katalizira „običnu“ fosforilaciju, donor P_i i energije je ATP; f) T
2. a) T; b) T; c) N – ima kinaznu aktivnost, ali supstrat je šećer, a ne protein; d) N – regulira se reverzibilnom kovalentnom preinakom; e) N – katalizira hidrolizu fruktoza-2,6-bisfosfata na fruktozu-6-fosfat i ortofosfat; f) N – ima dvije domene koje se recipročno reguliraju
3. Reakcije fosforilacije na razini supstrata su reakcije koje kataliziraju enzimi gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, fosfoglicerat kinaza i piruvat kinaza pa treba strukturnim formulama prikazati te reakcije.
4. Brzina glikolize se regulira reakcijama koje kataliziraju heksokinaza, fosfofruktokinaza i piruvat kinaza pa treba strukturnim formulama prikazati te reakcije.
5. 3 ATP-a
6. To su reakcije koje kataliziraju enzimi heksokinaza, fosfofruktokinaza i piruvat kinaza pa treba strukturnim formulama prikazati te reakcije.
7. $\text{fruktoza} + 2P_i + 2ADP \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2ATP + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$

8. Galaktoza se uključuje u glikolizu nizom reakcija koje kataliziraju enzimi galaktokinaza, galaktoza-1-fosfat uridiltransferaza i fosfoglukomutaza.
9. Energija u obliku ATP-a ili njegovih ekvivalenata se dobiva u reakcijama koje kataliziraju enzimi gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, fosfoglicerat kinaza i piruvat kinaza, pa treba strukturnim formulama prikazati te reakcije.
10. a) 3,48 g piruvata; b) 0,04 mol ATP-a; c) oslobodi se 1,22 kJ energije
11. a) alosterički aktivira piruvat kinazu – ubrzava glikolizu; b) ATP alosterički inhibira piruvat kinazu i fosfofruktokinazu – usporava glikolizu; c) alosterički inhibira piruvat kinazu – usporava glikolizu; d) ne djeluje direktno na brzinu glikolize; e) ne djeluje direktno na brzinu glikolize; f) ne djeluje direktno na brzinu glikolize; g) aktivira protein fosfatazu koja defosforilacijom fosfofruktokinaze 2 aktivira njenu kinaznu domenu; posljedica je sinteza fruktoza-2,6-bisfosfata i alosterička aktivacija fosfofruktokinaze 1 – ubrzava glikolizu
12. Do izomerizacije dolazi u reakcijama koje kataliziraju enzimi fosfoglukozna izomeraza, triozafosfat izomeraza i fosfoglicerat mutaza.
13. $V(\text{EtOH}) = 1,53 \text{ mL}$; $V(\text{CO}_2) = 590 \text{ mL}$

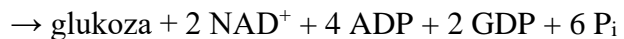
Zadatci za vježbu – ciklus limunske kiseline

1. $\text{acetil-CoA} + 3\text{NAD}^+ + \text{FAD} + \text{GDP} + \text{P}_i + 2\text{H}_2\text{O}$
 $\rightarrow 2\text{CO}_2 + 3\text{NADH} + \text{FADH}_2 + \text{GTP} + \text{CoA}$
2. $\text{acetil-CoA} + \text{oksalacetat} + 2\text{NAD}^+ + \text{FAD} + \text{GDP} + \text{P}_i + 2\text{H}_2\text{O}$
 $\rightarrow \text{malat} + 2\text{CO}_2 + 2\text{NADH} + \text{FADH}_2 + \text{GTP} + \text{CoA}$
3. $\text{acetil-CoA} + \text{oksalacetat} + 2\text{NAD}^+ + \text{FAD} + \text{GDP} + \text{P}_i + \text{H}_2\text{O}$
 $\rightarrow \text{fumarat} + 2\text{CO}_2 + 2\text{NADH} + \text{FADH}_2 + \text{GTP} + \text{CoA}$
4. Strukturnim formulama treba napisati reakcije koje kataliziraju enzimi izocitrat dehidrogenaza, α -ketoglutarat dehidrogenaza, sukcinat dehidrogenaza, malat dehidrogenaza.
5. $\text{glukoza} + 4\text{P}_i + 8\text{NAD}^+ + 2\text{ADP} + 2 \text{oksalacetat} + 2\text{GDP}$
 $\rightarrow 2 \text{sukcinat} + 2\text{ATP} + 6\text{CO}_2 + 8\text{NADH} + 2\text{GTP}$
6. Strukturnim formulama treba napisati reakcije koje kataliziraju enzimi izocitrat dehidrogenaza i α -ketoglutarat dehidrogenaza.
7. Strukturnim formulama treba napisati reakciju koju katalizira α -ketoglutarat dehidrogenaza. U reakciji dolazi do oksidacije i dekarboksilacije supstrata.
8. Strukturnim formulama treba napisati reakciju koju katalizira sukcinil-CoA sintetaza.
9. Strukturnim formulama treba napisati reakcije koje kataliziraju enzimi citrat sintaza (reakcija kondenzacije), izocitrat dehidrogenaza (reakcija oksidacije i dekarboksilacije), α -ketoglutarat dehidrogenaza (reakcija oksidacije i dekarboksilacije).
10. $\text{oksalacetat} + \text{NADH} + \text{FADH}_2 + \text{CoA} + \text{GTP}$
 $\rightarrow \text{sukcinil-CoA} + \text{NAD}^+ + \text{FAD} + \text{GDP} + \text{P}_i + \text{H}_2\text{O}$
11. $\text{acetil-CoA} + \text{oksalacetat} + 2\text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{sukcinil-CoA} + 2\text{CO}_2 + 2\text{NADH}$
12. $\text{acetil-CoA} + \text{oksalacetat} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \alpha\text{-ketoglutarat} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{CoA}$
13. Oksidativna dekarboksilacija α -ketoglutarata u sukcinilnu jedinicu; prostetske grupe: TPP, lipoamid, FAD; koenzimi: CoA i NAD^+

14. Reakcija koju katalizira citrat sintaza (alosterička inhibicija s ATP-om), reakcija koju katalizira izocitrat dehidrogenaza (alosterička inhibicija s NADH i ATP; alosterička aktivacija s ADP; kod biljaka dodatno mehanizam reverzibilne kovalentne preinake, inaktivacija fosforilacijom kod visoke koncentracije ATP-a i aktivacija defosforilacijom kod visoke koncentracije ADP-a), reakcija koju katalizira α -ketoglutarat dehidrogenaza (alosterička inhibicija s ATP, sukcinil-CoA i NADH).
15. $1,3\text{-bisfosfoglicerat} + \text{ADP} + \text{NADH} + \text{FADH}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{sukcinat} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{FAD}$
Ovim nizom reakcija potrošit će se energija ekvivalentna 3 ATP-a.

Zadatci za vježbu – glukoneogeneza

1. $2 \text{ laktat} + 4 \text{ ATP} + 2 \text{ GTP} + 4 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{glukoza} + 4 \text{ ADP} + 2 \text{ GDP} + 6 \text{ P}_i$
 $2 \text{ piruvat} + 2 \text{ NADH} + 4 \text{ ATP} + 2 \text{ GTP} + 4 \text{ H}_2\text{O}$



Kada glukoneogeneza teče od laktata u citosolu se dobije NADH u reakciji oksidacije laktata u piruvat, koji se u mitohondriju karboksilira u oksaloacetat pa dekarboksilira i fosforilira u fosfoenolpiruvat djelovanjem mitohondrijske fosfoenolpiruvat karboksikinaze. Ako se kreće od piruvata on se u mitohondriju karboksilira u oksaloacetat koji se reducira u malat i prenosi u citosol gdje se ponovo oksidira u oksaloacetat. Tako se potroši 2 mitohondrijska NADH na redukciju oksaloacetata u malat pa je taj put energetski manje povoljan nego kada se polazi od laktata.

2. Reakcije koje kataliziraju enzimi fosfoenolpiruvat karboksikinaza i fosfoglicerat kinaza.
3. Reakcije koje kataliziraju enzimi fruktoza-1,6-bisfosfataza (hidroliza), piruvat karboksilaza (karboksilacija), fosfoenolpiruvat karboksikinaza (dekarboksilacija i fosforilacija), glukoza-6-fosfataza (hidroliza).
4. $\text{malat} + \text{GTP} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} \rightarrow \text{gliceraldehid-3-fosfat} + \text{GDP} + \text{ADP} + \text{CO}_2 + \text{P}_i$
5. $2 \text{ fumarat} + 2 \text{ GTP} + 6 \text{ H}_2\text{O} + 2 \text{ ATP} \rightarrow \text{glukoza} + 2 \text{ CO}_2 + 2 \text{ GDP} + 2 \text{ ADP} + 4 \text{ P}_i$
Troši se energija ekvivalentna 4 ATP-a.
6. Reakcije koje kataliziraju enzimi fruktoza-1,6-bisfosfataza (alosterička inhibicija AMP-om i Fru-2,6-bisfosfatom, alosterička aktivacija citratom), piruvat karboksilaza (alosterička aktivacija s acetyl-CoA, alosterička inhibicija ADP-om), fosfoenolpiruvat karboksikinaza (alosterička inhibicija ADP-om).
7. a) oksaloacetat ide u glukoneogeneze jer stanici ne treba energije. Reakcija koju katalizira malat dehidrogenaza: $\text{oksalacetat} + \text{NADH} \rightarrow \text{malat} + \text{NAD}^+$; b) oksaloacetat ide u citratni ciklus da bi se ubrzalo dobivanje energije. Reakcija koju katalizira citrat sintaza: $\text{oksalacetat} + \text{acetyl-CoA} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{citrat} + \text{CoA}$
8. alanin – laktat – fumarat, malat (jednako su povoljni) – gliceraldehid-3-fosfat
9. Recipročna regulacija glikolize i glukoneogeneze se postiže djelovanjem istih alosteričkih efektor koji imaju suprotne efekte na enzime u ovim metaboličkim putevima. Fruktoza-2,6-bisfosfat je alosterički aktivator fosfofruktokinaze, a alosterički inhibitor fruktoza-1,6-bisfosfataze. AMP je alosterički aktivator fosfofruktokinaze, a inhibitor fruktoza-1,6-bisfosfataze. Citrat je alosterički inhibitor fosfofruktokinaze, a aktivator fruktoza-1,6-

bisfosfataze. ATP inhibira enzime glikolize fosfofruktokinazu i piruvat kinazu, a ADP inhibira enzime glukoneogeneze fosfoenolpiruvat karboksikinazu i piruvat karboksilazu.

10. 1.) potroši se 6 ekvivalenata ATP; 2.) potroše se 4 ekvivalenta ATP
11. $2 \text{ laktat} + 4\text{ATP} + 2\text{GTP} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{dihidroksiacetonfosfat} + \text{gliceraldehid-3-fosfat} + 4\text{ADP} + 2\text{GDP} + 4\text{P}_i$
12. Fru-2,6-bisfosfat alosterički aktivira fosfofruktokinazu, a inhibira fruktoza-1,6-bisfosfatazu i na taj način ubrzava glikolizu, a usporava glukoneogenezu.
 $\text{fruktoza-1-fosfat} + \text{ATP} \rightarrow \text{fruktoza-1,6-bisfosfat} + \text{ADP}$
(enzim: fosfofruktokinaza)
 $\text{fruktoza-1,6-bisfosfat} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{fruktoza-6-fosfat} + \text{P}_i$
(enzim: fruktoza-1,6-bisfosfataza)

Zadatci za vježbu – gliksilatni ciklus

1. $2 \text{ acetil-CoA} + \text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{sukcinat} + 2 \text{ CoA} + \text{NADH}$
2. $\text{acetil-CoA} + \text{oksalacetat} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{izocitrat} + \text{CoA}$
3. $2 \text{ acetil-CoA} + \text{oksalacetat} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{sukcinat} + \text{malat} + 2 \text{ CoA}$
4. Reakcije koje kataliziraju izocitrat liaza i malat sintaza.
5. 1. ATP aktivira protein kinazu koja će fosforilirati i inaktivirati izocitrat dehidrogenazu, a također ATP alosterički aktivira izocitrat liazu; 2. Nema aktivacije izocitrat liaze, a dehidrogenaza se defosforilira i aktivira djelovanjem protein fosfataze koju alosterički aktivira ADP.
6. Izocitrat liaza se aktivira alosterički kod visoke koncentracije ATP-a. Kod niske koncentracije ATP-a je slabo aktivna jer nije alosterički aktivirana, a ima mali afinitet za izocitrat. Izocitrat dehidrogenaza se inaktivira reverzibilnom kovalentnom modifikacijom fosforilacijom kod visoke koncentracije ATP-a. Kod niske koncentracije ATP-a izocitrat dehidrogenaza se defosforilira i postaje opet aktivna.
7. Reakcija koju katalizira piruvat dehidrogenaza, zatim citrat sintaza, akonitaza i izocitrat liaza.
8. a) niz reakcija koje kataliziraju enzimi piruvat karboksilaza, malat dehidrogenaza, fumaraza i sukcinat dehidrogenaza. Utroši se energija ekvivalentna 5 ATP-a; b) niz reakcija koje katalizira piruvat dehidrogenaza, zatim citrat sintaza, akonitaza i izocitrat liaza. Dobije se energija ekvivalentna 2,5 ATP-a.
9. Niz reakcija glikolize, piruvat dehidrogenaze i gliksilatnog ciklusa zaključno s izocitrat liazom. Ovim nizom reakcija dobije se energija ekvivalentna 10 ATP-a.
10. Niz reakcija glikolize, piruvat dehidrogenaze i gliksilatnog ciklusa zaključno s izocitrat liazom.
 $\text{fruktoza-1-fosfat} + 4 \text{ NAD}^+ + 2 \text{ P}_i + 3 \text{ ADP} + 2 \text{ oksaloacetat}$
 $\rightarrow 2 \text{ sukcinat} + 2 \text{ gliksilat} + 2\text{CO}_2 + 4\text{NADH} + 3 \text{ ATP}$
Ovim nizom reakcija dobije se energija ekvivalentna 11 ATP.
11. Niz reakcija koje katalizira citrat sintaza, akonitaza, izocitrat liaza, sukcinat dehidrogenaza, fumaraza, malat dehidrogenaza i fosfoenolpiruvat karboksikinaza. Osim

toga odvijaju se još reakcije koje katalizira malat sintaza i malat dehidrogenaza kojima se regenerira oksaloacetat u glioksilatnom ciklusu.

12. Niz reakcija koje kataliziraju enzimi piruvat dehidrogenaza, citrat sintaza, akonitaza, izocitrat liaza i malat sintaza. Dobit će se energija ekvivalentna 5 ATP.
13. 1.) +13,5 ekvivalenata ATP; 2.) +16,5 ekvivalenata ATP

Zadatci za vježbu – put pentoza-fosfata

1. Reakcija koju katalizira 6-fosfoglukonat dehidrogenaza.
2. Reakcija koju katalizira glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (oksidacija); reakcija koju katalizira laktonaza (hidroliza); reakcija koju katalizira 6-fosfoglukonat dehidrogenaza (oksidacija i dekarboksilacija).
3. 28 ATP
4. 28 ATP
5. 0,83 ATP-a za jednu molekulu riboza-5-fosfata
6. $3 \text{ glukoza} + 6\text{NADP}^+ + 3\text{H}_2\text{O} + 5\text{P}_i + 5\text{NAD}^+ \rightarrow 3\text{CO}_2 + 6\text{NADPH} + 5 \text{ 2-fosfoglicerat} + 5\text{NADH}$
7. $3 \text{ glukoza} + 6\text{NADP}^+ + 3\text{H}_2\text{O} + 5\text{P}_i + 5\text{NAD}^+ \rightarrow 3\text{CO}_2 + 6\text{NADPH} + 5 \text{ 3-fosfoglicerat} + 5\text{NADH}$
8. $3 \text{ glukoza} + 5\text{ATP} + 6\text{NADP}^+ + 3\text{H}_2\text{O} + 5\text{P}_i + 5\text{NAD}^+ \rightarrow 3\text{CO}_2 + 6\text{NADPH} + 5 \text{ 1,3-bisfosfoglicerat} + 5\text{NADH} + 5\text{ADP}$
9. $3 \text{ riboza-5-fosfat} + 8\text{ADP} + 10\text{P}_i + 25\text{NAD}^+ + 5\text{FAD} + 5\text{GDP} + 5\text{H}_2\text{O} \rightarrow 15\text{CO}_2 + 25\text{NADH} + 8\text{ATP} + 5\text{FADH}_2 + 5\text{GTP}$
10. $3 \text{ fruktoza-6-fosfat} + \text{ADP} + \text{P}_i + \text{NAD}^+ \rightarrow 3 \text{ riboza-5-fosfat} + \text{piruvat} + \text{ATP} + \text{NADH} + \text{H}_2\text{O}$
11. 1. $\text{glukoza-6-fosfat} + 2\text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{riboza-5-fosfat} + \text{CO}_2 + 2\text{NADPH}$
2. $3 \text{ riboza-5-fosfat} \rightarrow 2 \text{ fruktoza-6-fosfat} + \text{gliceraldehid-3-fosfat}$
12. $3 \text{ glukoza} + 5\text{ATP} + 6\text{NADP} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 5 \text{ gliceraldehid-3-fosfat} + 3\text{CO}_2 + 5\text{ADP} + 6\text{NADPH}$
13. 1. $12 \text{ glicerol-3-fosfat} + 12 \text{ NAD}^+ + 13 \text{ H}_2\text{O} + 12 \text{ NADP}^+ \rightarrow 6 \text{ CO}_2 + 12 \text{ NADPH} + 5 \text{ glukoza-6-fosfat} + 12 \text{ NADH} + 7 \text{ P}_i$
2. $6 \text{ glicerol-3-fosfat} + 11 \text{ NAD}^+ + 8 \text{ ADP} + 2 \text{ P}_i + 6 \text{ NADP}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 5 \text{ piruvat} + 3 \text{ CO}_2 + 6 \text{ NADPH} + 11 \text{ NADH} + 8 \text{ ATP}$
14. $V(\text{O}_2) = 9,24 \text{ L}$

Zadatci za vježbu – fotosinteza

1. $4,818 \times 10^{24}$
2. $1,606 \times 10^{24}$
3. $1,204 \times 10^{24}$
4. $2,409 \times 10^{24}$
5. $2,409 \times 10^{24}$
6. c) $\text{riboza-5-fosfat} + 3\text{ATP} + 2\text{NADPH} + \text{CO}_2 + 3 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{glukoza} + 3\text{ADP} + 2\text{NADP}^+ + 4\text{P}_i$

7. $6,667 \times 10^{-5}$ mola
8. $1,998 \times 10^{-4}$ mola
9. $1,332 \times 10^{-4}$ mola
10. $1,115 \times 10^{-5}$ mola

Zadaci za vježbu – glikogen

1. Supstrati protein kinaze A su: kinaza glikogen fosforilaze (aktivira je); glikogen sintaza (inhibira je); protein fosfataza 1 (inhibira je); inhibitor protein fosfataze 1 (aktivira ga). Pada koncentracija glikogena u stanici.
2. Kinaza glikogen fosforilaze se ne može aktivirati fosforilacijom uslijed mutacije i posljedično aktivirati glikogen fosforilazu, ali se glikogen fosforilaza alosterički aktivira AMP-om pa počinje razgradnja glikogena, ali sporo jer je glikogen fosforilaza samo djelomično aktivna. Stupanj inhibicije glikogen sintaze je također manji nego što bi trebao biti jer je inhibiraju samo protein kinaza A i glikogen sintaze kinaza 3. Protein fosfataza 1 je inaktivna. Koncentracija glikogena sporo opada.
3. Glikogen sintaze kinaza 3 se ne može inaktivirati fosforilacijom pa nastavlja inhibiciju glikogen sintaze. Stoga je glikogen sintaza i dalje djelomično inhibirana i sinteza glikogena teče sporije nego što bi to u ovim uvjetima trebala. Razgradnja glikogena ne teče jer su kinaza glikogen fosforilaze i glikogen fosforilaza inaktivne u ovim uvjetima. Protein fosfataza 1 je aktivna.
4. Glikogen fosforilaza se ne može aktivirati fosforilacijom uslijed mutacije iako je kinaza glikogen fosforilaze potpuno aktivirana (fosforilacijom i alosterički kalcijevim ionima), pa nema razgradnje glikogena. Glikogen sintaza i protein fosfataza 1 su inaktivirane pa ne teče niti sinteza glikogena. Koncentracija glikogena se ne mijenja.
5. Inzulinska kaskada će inaktivirati glikogen sintaze kinazu 3 i aktivirati protein fosfatazu 1, ali se protein fosfataza 1 ne može otpustiti iz kompleksa s glikogen fosforilazom i inaktivirati je defosforilacijom. Stoga ne može defosforilirati niti kinazu glikogen fosforilaze niti glikogen sintazu. Razgradnja glikogena se nastavlja, a sinteza ne može teći jer protein fosfataza 1 ne može aktivirati glikogen sintazu.
6. Protein kinaza B – aktivira se autofosforilacijom, potiče sintezu i koči razgradnju glikogena tako što fosforilacijom aktivira protein fosfatazu 1 i inaktivira kinazu glikogen sintaze 3. Protein fosfataza 1 defosforilira i time inaktivira glikogen fosforilazu i kinazu glikogen fosforilaze, a aktivira glikogen sintazu. Kinaza glikogen sintaze 3 je inaktivirana pa ne može inhibirati glikogen sintazu. Teče sinteza, a ne ide razgradnja glikogena.
7. Adenilat ciklaza se aktivira alosterički interakcijom sa α -podjedinicom G-proteina. Protein kinaza A se aktivira pomoću cAMP-a koji se veže na regulatornu podjedinicu protein kinaze A uslijed čega dolazi do promjene njene konformacije i na taj način razara kompleks regulatorne i katalitičke podjedinice, pa katalitička postaje aktivna (regulatorna podjedinica ima ulogu pseudosupstrata).
8. Potrebni su enzimi glikogen fosforilaza, α -1,6-glukozidaza i transferaza. Produkti reakcije su 20 molekula glukoze-1-fosfata i jedna molekula glukoze.
9. Glikogen fosforilaza, transferaza i α -1,6-glukozidaza sudjeluju u razgradnji glikogena. U sintezi glikogena sudjeluju glikogenin, glikogen sintaza i enzim grananja.

Zadatci za vježbu – metabolizam masnih kiselina

1. **Enzim:**
acetil-transacilaza
malonil-transacilaza
acil-malonil-ACP kondenzirajući enzim
 β -ketoacil reduktaza
dehidrataza
enoil reduktaza
- Kemijska definicija:**
prijenos acilne grupe
prijenos acilne grupe
kondenzacija i dekarboksilacija
redukcija β -hidroksiacila
dehidracija
redukcija
2. **Enzim:**
acil-CoA dehidrogenaza
enoil-CoA hidrataza
L-hidroksiacil-CoA-dehidrogenaza
 β -ketotiolaza
- Kemijska definicija:**
oksidacija
hidratacija
oksidacija
tioliza
3. Strukturnim formulama treba napisati reakcije koje kataliziraju enzimi citrat sintaza, citrat liaza i acetil-CoA karboksilaza.
4. Supstrati / kosupstrati su acetil-CoA, NADPH, malonil-CoA i propionil-CoA; odvija se u uvjetima kada stanica ima puno energije; odvija se u citosolu na kompleksu sintaze masnih kiselina.
5. $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO-SCoA} + 6\text{FAD} + 6\text{NAD}^+ + 6\text{H}_2\text{O} + 6\text{HS-CoA}$
 $\rightarrow 7 \text{ acetil-CoA} + 6\text{FADH}_2 + 6\text{NADH}$
6. Razgradnja masnih kiselina 1. c), 2. e), 3. j), 4. f), 5. a), 6. d)
Sinteza masnih kiselina 1. g), 2. b), 3. k), 4. i), 5. h)
7. $8 \text{ fosfoenolpiruvat} + 7\text{ATP} + 14 \text{ NADPH} + 8 \text{ NAD}^+$
 $\rightarrow \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH} + 7\text{ADP} + 15 \text{ P}_i + 14 \text{ NADP}^+ + 8 \text{ NADH} + 8 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}$
8. $\text{propionil-CoA} + 6 \text{ malonil-CoA} + 12 \text{ NADPH}$
 $\rightarrow \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH} + 12 \text{ NADP}^+ + 6\text{CO}_2 + 5\text{H}_2\text{O} + 7 \text{ CoA}$
 $\text{Glukoza-6-P} + 12 \text{ NADP}^+ + 7 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 6 \text{ CO}_2 + 12 \text{ NADPH} + 12 \text{ H}^+ + \text{P}_i$
Dovoljno je razgraditi jednu molekulu glukoza-6-fosfata.
9. 4,087 kJ
10. 154 ATP
11. 205 ATP
12. 103 ATP
13. 22,5 kJ
14. $(\text{C}18:2)_{\text{m.k.}} + \text{ATP} + 6\text{FAD} + 17\text{NAD}^+ + 8 \text{ H}_2\text{O} + 9 \text{ oksaloacetata}$
 $\rightarrow 9 \text{ CO}_2 + 9 \alpha\text{-ketogutarata} + \text{AMP} + \text{PP}_i + 6 \text{ FADH}_2 + 17 \text{ NADH}$
energetska bilanca: $-2 \text{ ATP} + 6\text{FAD} + 17 \text{ NADH} = -2 + 9\text{ATP} + 42,5\text{ATP} = 49,5 \text{ ATP}$
Dobije se ukupno 49,5 ATP-a.
15. $m_{(\text{trioleilglicerol})} = 53,92 \text{ g}$
16. $3 \text{ fruktoza} + 5\text{ATP} + 12\text{NAD}^+ + 10\text{NADPH}$
 $\rightarrow \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH} + 5\text{ADP} + 5\text{P}_i + 12\text{NADH} + 10\text{NADP}^+ + 4\text{H}_2\text{O} + 6\text{CO}_2$
 $V(\text{CO}_2) = 6,7 \text{ mL}$

17. 363 ATP
18. $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH} + \text{ATP} + 2 \text{CoA} + 7 \text{FAD} + 7 \text{NAD}^+ + 10 \text{H}_2\text{O}$
 $\rightarrow 3 \text{acetoacetat} + \text{propionil-CoA} + \text{acetil-CoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i + 7 \text{FADH}_2 + 7 \text{NADH}$
 Dobit će se energija ekvivalentna 26 ATP.
19. 48 ATP
20. 2,51 kJ
21. 196 ATP
22. Acetilne jedinice se uključuju u glioksilatni ciklus i prevode u sukcinat. Sukcinat se prevodi u malat i zatim glukoneogenezom u glukozu. Za tri glukoze potrebno je u glukoneogenezu uvesti 6 malata, odnosno u glioksilatnom ciklusu dobiti 6 sukcinata. U glioksilatni ciklus mora ući 12 acetil-CoA da bi se dobilo 6 sukcinata, stoga masna kiselina koja će dati dovoljan broj acetilnih jedinica za ovu sintezu mora imati 24C atoma.
 $4 \text{acetil-CoA} + 2 \text{NAD}^+ + 10 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{FAD} + 2 \text{ATP} + 2 \text{GTP}$
 $\rightarrow \text{glukoza} + 2 \text{CO}_2 + 2 \text{NADH} + 2 \text{FADH}_2 + 2 \text{ADP} + 2 \text{GDP} + 4 \text{P}_i$
23. Treba napisati reakcije koje kataliziraju enzimi piruvat kinaza, piruvat dehidrogenaza, citrat sintaza i citrat liaza. Dobiva se 2,5 ATP-a.
24. Dobit će se 4 ATP.
25. 59 J

Zadatci za vježbu – metabolizam aminokiselina i urea ciklus

1. $\text{CO}_2 + \text{NH}_4^+ + \text{ornitin} + \text{aspartat} + \text{H}_2\text{O} + 3\text{ATP}$
 $\rightarrow \text{arginin} + \text{AMP} + \text{PP}_i + \text{fumarat} + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i$
 Karbamoil-fosfat se sintetizira iz CO_2 i NH_4^+ uz utrošak 2 ATP-a pri čemu se ATP razgrađuje do 2 ADP i 2 P_i . Karbamoil-fosfat, ornitin i aspartat se kondenziraju u argininosukcinat pri čemu se jedan ATP razgrađuje do AMP i PP_i . Ornitin se ne regenerira jer je ciklus zaustavljen kod reakcije koju bi trebala katalizirati arginaza, a krajnji produkti ciklusa su fumarat i arginin.
2. karbamoil-fosfat + ATP + $2\text{H}_2\text{O}$ + NAD^+ + α -aminokiselina
 $\rightarrow \text{urea} + \text{AMP} + \text{PP}_i + \text{P}_i + \text{NADH} + \alpha$ -ketokiselina
3. Glutamat se oksidativno deaminira u α -ketoglutarat, pri čemu se dobije slobodan NH_4^+ i reducirani koenzim NADH. NH_4^+ se kondenzira sa CO_2 uz utrošak 2 ATP-a i nastaje karbamoil-fosfat. Karbamoil-fosfat i aspartat se reakcijama urea ciklusa prevode u ureu i fumarat uz utrošak još jedne molekule ATP-a do AMP i PP_i . Ukupno se u ovom nizu potroši 2,5 ekvivalenta ATP po molekuli uree (+1,5 ATP od oksidacije NADH – 4 visokoenergetske veze iz ATP-a), odnosno 3 molekule ATP-a.
4. $2 \text{alanin} + 2\text{CO}_2 + 4\text{ATP} + \text{NAD}^+ + 3\text{H}_2\text{O}$
 $\rightarrow \text{piruvat} + \text{urea} + \text{fumarat} + \text{NADH} + 3\text{ADP} + 3\text{P}_i + \text{AMP} + \text{PP}_i$
 Alanin s α -ketoglutaratom u reakciji transaminacije daje piruvat i glutamat. Piruvat se uz utrošak ATP-a karboksilira u oksaloacetat, koji se s drugom molekulom alanina transaminira u aspartat i piruvat. Glutamat nastao prvom reakcijom se oksidativno deaminira u α -ketoglutarat i NH_4^+ (uz NAD^+ koji se reducira u NADH). Time je regeneriran α -ketoglutarat pa se ne pojavljuje u zbirnoj jednadžbi. NH_4^+ i druga molekula CO_2 se kondenziraju u

karbamoil-fosfat uz utrošak 2 ATP-a. Aspartat, karbamoil-fosfat i ornitin ulaze u urea ciklus gdje nastaje urea i fumarat, pri čemu se jedan ATP cijepa na AMP i PP_i, a ornitin se regenerira pa se ne pojavljuje u zbirnoj jednadžbi.

5. ornitin + karbamoil-fosfat + malat + ATP + NAD⁺ + α-aminokiselina
→ arginin + fumarat + AMP + PP_i + P_i + NADH + α-ketokiselina
6. 0,033 mol serina
7. Za sintezu arginina potrebne su dvije molekule glutamata, karbamoil-fosfat i aspartat. Iz dvije molekule glutamata će se sintetizirati ornitin i α-ketoglutarat. Aspartat se može dobiti oksidacijom malata u oksaloacetat i njegovom transaminacijom uz treći glutamat, čime nastaje aspartat i α-ketoglutarat. Karbamoil-fosfat će se sintetizirati iz CO₂ i NH₄⁺. U urea ciklusu će se iz ornitina, karbamoil-fosfata i aspartata sintetizirati arginin i fumarat. Iz dva α-ketoglutarata se reduktivnom aminacijom mogu dobiti 2 glutamata, pa još jednom aminacijom 2 glutamina. Ukupno će se dobiti 1 molekula arginina i 2 molekule glutamina, a potrošit će se 5 NH₄⁺.
8. 2-fosfoglicerat se glikolizom prevodi u piruvat, koji se karboksilira u oksaloacetat. Oksaloacetat se zatim u reakciji transaminacije s glutamatom prevodi u aspartat. Aminacijom aspartata se dobije asparagin. Ovim nizom reakcija potrošilo bi se 2 ekvivalenta ATP jer se u reakciji aminacije aspartata ATP cijepa na AMP i PP_i.
9. Za uklanjanje amonijaka dobivenog ovim nizom reakcija potrebna su 4 ATP-a, a razgradnjom glutamata se dobije 10 ATP-a. Stoga je dobivena energija dovoljna za uklanjanje dobivenog amonijaka.
10. piruvat + NAD⁺ + CoA → acetil-CoA + NADH + CO₂ (enzim: piruvat dehidrogenaza)
acetil-CoA + oksaloacetat → citrat + CoA (enzim: citrat sintaza)
citrat → izocitrat (enzim: akonitaza)
izocitrat + NAD⁺ → α-ketoglutarat + CO₂ + NADH (enzim: izocitrat dehidrogenaza)
α-ketoglutarat + alanin → glutamat + piruvat (enzim: glutamat transaminaza)
glutamat + NH₄⁺ + ATP → glutamin + ADP + P_i (enzim: glutamin sintetaza)
Ovim nizom reakcija dobit će se energija ekvivalentna 4 ATP.
11. alanin + oksaloacetat → piruvat + aspartat (enzim: aspartat transaminaza)
piruvat + NAD⁺ + CoA → acetil-CoA + NADH + CO₂ (enzim: piruvat dehidrogenaza)
acetil-CoA + oksaloacetat → citrat + CoA (enzim: citrat sintaza)
citrat → izocitrat (enzim: akonitaza)
izocitrat + NAD⁺ → α-ketoglutarat + CO₂ + NADH (enzim: izocitrat dehidrogenaza)
α-ketoglutarat + NADPH + NH₄⁺ → glutamat + NADP⁺ (enzim: glutamat dehidrogenaza)
glutamat + NH₄⁺ + ATP → glutamin + ADP + P_i (enzim: glutamin sintetaza)
Ovim nizom reakcija dobit će se energija ekvivalentna 4 ATP
12. Supstrat za reakciju koju katalizira glutamin sintetaza je glutamat. Glutamat se u ovom slučaju dobije reduktivnom aminacijom α-ketoglutarata. Gliceraldehid-3-fosfat treba glikolizom prevesti u piruvat, pa zatim u acetil-CoA i uključiti sa oksaloacetatom u citratni ciklus do α-ketoglutarata. Dobilo bi se ukupno 8,5 ekvivalenta ATP-a.
13. Dobit će se 5 ATP.
14. Dobit će se 2,5 ATP.

POPIS LITERATURE

1. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biokemija (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, 2013
2. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, Biochemistry (6th edition), W.H. Freeman and Co., New York, 2007.
3. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, Biochemistry (9th edition), W.H. Freeman and Co., New York, 2019.
4. D.L. Nelson, M.M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry (4th edition), Worth Publisher, New York, 2004.