

## Chapte 4: **Biomolecular Principles:**

### **Proteins**

Розділ 4.

### **Основи біохімії та молекулярної біології: Білки**

#### КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Опишіть різні рівні структури білка. Яким чином структура білка визначається експериментально?
2. Чому пост-трансляційна модифікація білка варта уваги?
3. Опишіть, що таке гідрофобний ефект і яку роль він відіграє у ході реакції згортання білку.
4. Опишіть різницю між моделлю «ключ-замок» та моделлю індукованої відповідності. Обґрунтуйте, чому модель індукованої відповідності більш доречна для опису закономірностей функціонування ензимів.
5. Наведіть кілька прикладів, яким чином ліки можуть функціонувати у ролі ферментних інгібіторів.
6. Визначте, які білки формують четвертинну структуру:  $\alpha$ -хімотрипсин, гемоглобін, інсулін, міоглобін чи трипсин. Використовуйте додаткові джерела.

## КОНТРОЛЬНІ ЗАВДАННЯ

1. Клітини мають поверхневі рецептори, які здатні розпізнавати та зв'язувати трипептид RGD (Arg-Gly-Asp). Тканинні інженери інколи використовують цей адгезивний пептид для зв'язування синтетичних біоматеріалів з клітинами.

Завдання.

а) Складіть структурну формулу трипептиду RGD.

б) Напишіть рівняння кислотної іонізації для кожної функціональної групи, яка дисоціюється. Визначте ступінь іонізації для кожної функціональної групи при  $\text{pH}=7,4$  за рівнянням Гендерсона-Хассельбаха. Константи кислотної іонізації див. Таблицю 1.

Таблиця 1.

Функціональна група	Константа кислотної іонізації (pK <sub>A</sub> )
$\alpha$ -COOH	2,0
$\alpha$ -NH <sub>2</sub>	9,0
Arg -NH	12,5
Asp -COOH	3,9

в) Визначте сумарний заряд трипептиду RGD при фізіологічному значенні  $\text{pH}$ .

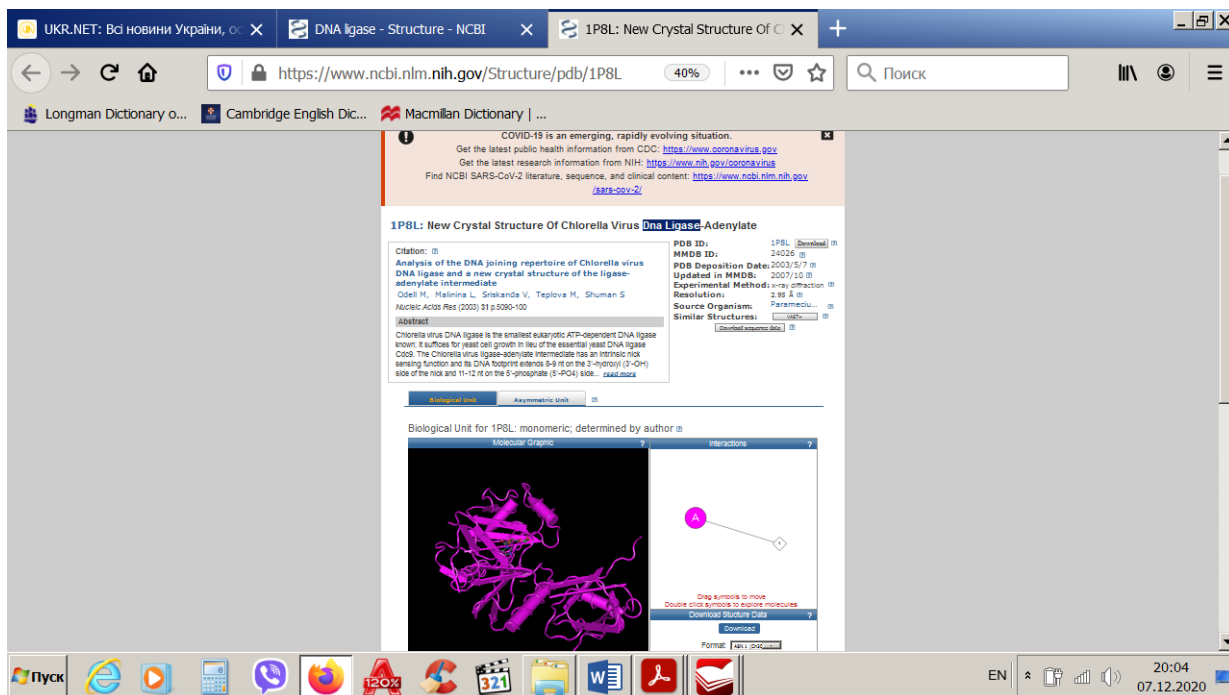
2. Оберіть один з ензимів, який бере участь у реплікації ДНК (див. [3.3.2 DNA replication](#) або [3.6.1 Molecular cloning - Restriction enzymes](#)).

Завдання.

а) Опишіть функції ензиму.

б) Знайдіть тримірну структуру обраного ензиму у базі даних на сайті Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) за посиланням – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>.

Наприклад:



Роздрукуйте знайдену структуру та включіть її у домашнє завдання.

ⓘ **Увага!** Для того, щоб роздрукувати файл зі структурою, відкрийте його у Cn3D (потребує завантаження) та оберіть формат даних для зберігання. Далі оберіть опцію “File/Export PNG”, збережіть файл та роздрукуйте його.

в) Опишіть, яким чином структура ензиму сприяє його функціонуванню.

3. Концентрація продукту Р вимірювалась у ході реакції за допомогою ультрафіолетової спектроскопії. Отримані дані наведені у Таблиці 2. Приблизно розрахуйте початкову швидкість реакції.

Таблиця 2.

Час, години	Концентрація продукту Р (моль/л)
0	0
1	0,24
2	0,47
3	0,70
4	0,91

4. Пеніцилін піддається гідролізу і тому нейтралізується пеніциліназою (або  $\beta$ -лактамозою) – ензимом, який виробляють деякі антибіотикорезистентні бактерії. Наприклад, маса пеніцилінази у *Staphylococcus aureus* складає 29,6 кДа. (кДа – кілодальтон; дальтон – несистемна одиниця маси, рівна уніфікованій атомній одиниці маси. Використовується в біохімії та молекулярній біології. Наприклад, білок з масою 15 кДа має молекулярну масу 15 000 г/моль).

Вихідні умови.

Пеніцилін піддається гідролізу у розчині очищеної пеніцилінази. Об'єм розчину – 10 мл, маса ензиму –  $10^{-9}$  г, час проведення випробування – 1 хв. Залежність кількості продукту від концентрації пеніциліну у ході реакції наведена у Таблиці 3. Припускайте, що концентрація пеніциліну під час випробування змінюється лінійно.

Таблиця 3.

Концентрація пеніциліну (мікромольна)	Кількість продукту гідролізу (наномольна)
1	0,11
3	0,25
5	0,34
10	0,45
30	0,58
50	0,61

Завдання.

а) Побудуйте графік залежності  $V_0$  від  $[S]$ . Визначте, чи можна описати гідроліз пеніциліну рівнянням Міхаеліса-Ментен. Якщо так, визначте константу Міхаеліса  $K_m$ .

б) Визначте максимальну швидкість реакції  $V_{max}$ . Укажіть на графіку, як ви визначили  $K_m$  та  $V_{max}$ .

в) Напишіть рівняння Міхаеліса-Ментен та виведіть рівняння Лайнвівера-Берка.

г) Побудуйте графік залежності  $1/V_0$  від  $1/[S]$ .

д) Визначте  $K_m$  та  $V_{max}$  за допомогою графіка Лайнвівера-Берка. Укажіть на графіку відповідні точки та яким чином їх отримати.

е) Припустимо, що молекула ензиму має один активний центр. Розрахуйте число оборотів при даних умовах.

є) Розрахуйте час, за який гідролізується одна молекула пеніциліну.

5. Глутамінова кислота (одна із стандартних амінокислот) має бічний ланцюг – карбоксильну групу  $COOH$  ( $pK_A=4,3$ ). Див. Рис. 1 та Рис. 2.

Рисунок 1. Дисоціація глутамінової кислоти

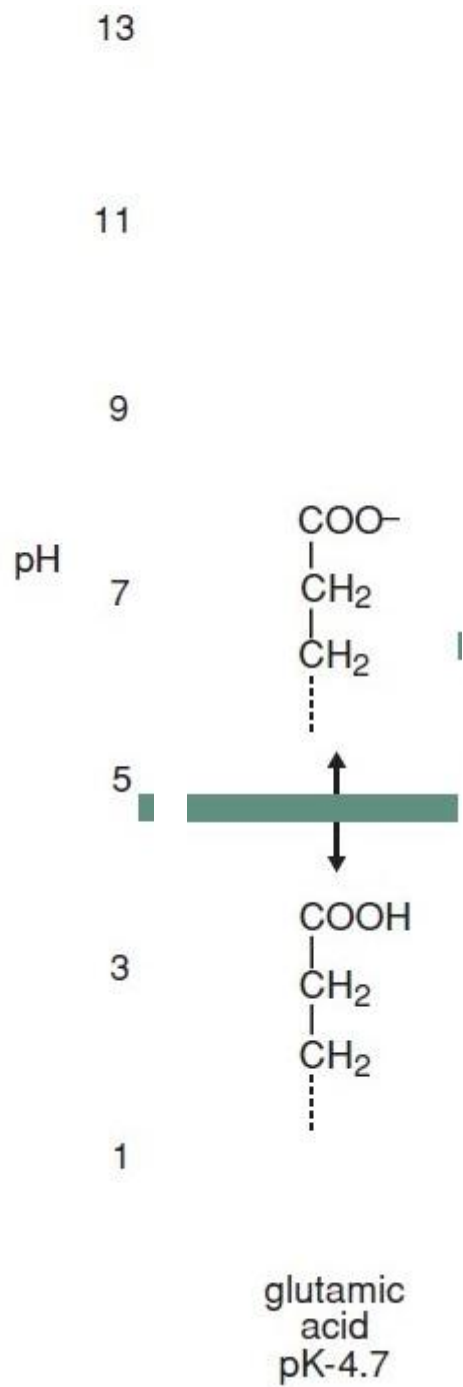
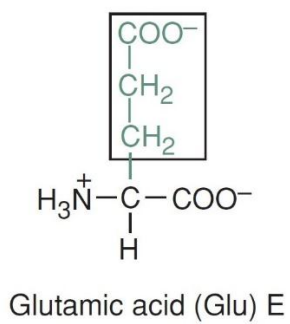


Рисунок 2. Структурна формула глутамінової кислоти



Завдання.

а) Напишіть рівняння кислотної дисоціації для карбоксильної групи. Виділіть слабу кислоту та спряжену основу.

б) Рівняння Гендерсона-Хассельбаха можна використовувати для визначення ступеня іонізації слабкої кислоти:

$$pH = pK_A + \log [base]/[acid].$$

Визначте за цим рівнянням, в якому стані знаходиться карбоксильна група при фізіологічному рН – протонованому або непротонованому.

6. Ензими каталізують біохімічні реакції.

Завдання.

а) Опишіть, за рахунок чого ензим підвищує швидкість реакції.

б) Поясніть, як участь ензиму впливає на зміни енергії Гіббса.

7. Рівняння Міхаеліса-Ментен описує кінетику ферментативних реакцій та має наступний вигляд:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m},$$

Завдання.

а) Оберіть будь-який ензим-субстратний комплекс. Побудуйте графік, який описує кінетику реакції за рівнянням Міхаеліса-Ментен. Позначте осі графіку – змінну та функційну залежність; позначте константи  $V_{\max}$  та  $K_m$ .

б) Оберіть інший субстрат, з яким ензим із завдання а) має нижчу спорідненість. На графіку а) побудуйте криву залежності  $V_0$  від  $[S]$ .

в) На графіку для комплексу із завдання а) побудуйте криву залежності  $V_0$  від  $[S]$ , приймаючи, що концентрація ензиму зростає вдвічі.

8. Значення константи Міхаеліса для деяких ензимів наведені у Таблиці 4.

Визначте, який з ензимів має вищу спорідненість до субстрату. Обґрунтуйте вашу відповідь.

Таблиця 4.

Ензим	Константа Міхаеліса $K_m$ (М)
Хімотрепсін	0,0150
Пепсін	0,0003
Рібонуклеаза	0,0097

9. Карбоангідраза – ензим, який бере участь у гідратації вуглекислого газу  $CO_2$ .

Близько 11%  $CO_2$  у крові переноситься гемоглобіном еритроцитів. Майже весь вуглекислий газ, який попадає у еритроцити, розчиняється у цитоплазмі. Далі він реагує з водою; створюється вуглекислота, яка миттєво дисоціює на іони водню та бікарбонат. Карбоангідраза у еритроцитах каталізує реакцію дисоціації, при цьому швидкість реакції зростає приблизно у 250 разів. За рахунок гідратації рівень  $CO_2$  у клітинах нижче, ніж у тканинній рідині. Зниження внутрішньоклітинного рівня  $CO_2$  важливе, так як градієнт концентрації між тканинною рідиною та навколишніми клітинами сприяє більш ефективній дифузії  $CO_2$  та швидшому його виведенню з клітин.

Випробуваннями, які моделюють фізіологічні умови, встановлено, що за участю карбоангідрази ( $K_m = 1000$  мкМ/л) 5% від 0,840993 М вихідної кількості  $CO_2$  гідратується упродовж 2 секунд.

Завдання.

Визначте кількість  $CO_2$ , яка отримується через 10 с, 30 с та 60 с реакції гідратації. Для спрощення розрахунків доцільно робити будь-які припущення.