

Kolo: Krajské

Kategória: B

Teoreticko-praktická časť – Praktická úloha č. 1

Téma: Biochémia – enzýmy

Všetky známe živé organizmy na Zemi sú závislé od enzymatickej katalýzy. Reakcie katalyzované enzýmami, by totiž spontánne prebiehali príliš pomaly. Navyše, bunky môžu priamo kontrolovať rôzne chemické reakcie prostredníctvom regulácie množstva a aktivity svojich enzýmov. Veľmi zaujímavou a dôležitou skupinou enzýmov sú antioxidantné enzýmy, ktoré využívajú aeróbne organizmy na ochranu voči toxickým produktom vlastného metabolizmu. Keďže pri aeróbnej oxidácii dochádza k vzniku tzv. reaktívnych foriem kyslíka (ROS – napr. peroxidy, superoxidy a. i.), ktoré by mohli poškodiť dôležité súčasti bunky, majú organizmy zvyčajne viac antioxidantných enzýmov špecializovaných na detoxikáciu rôznych ROS. V tejto úlohe sa budete zaoberať katalázou, ktorá katalyzuje rozklad peroxidu vodíka na vodu a kyslík. Túto reakciu budete sledovať po pridaní H_2O_2 k výluhu zo zemiakovej hľuzy – zo zmesi sa budú uvoľňovať bublinky kyslíka. Aby ste mohli porovnať rýchlosť reakcie v rôznych podmienkach, pridáte ešte trochu saponátu, ktorý zachytí bublinky v podobe peny a tak vám umožní na konci experimentu odhadnúť celkové množstvo vyprodukovaného kyslíka.

Aktivita katalázy z hľuzy zemiaka (*Solanum tuberosum*) pri rôznych teplotách

Pomôcky a materiál: 3 rovnaké skúmavky, stojan na skúmavky, papierové utierky, roztok saponátu, extrakt zo zemiaku, 3% roztok H_2O_2 , fixka na sklo, pipeta, kvapkadlo, pravítko, kadičky s teplou a studenou vodou a vodou izbovej teploty, teplomer

Postup:

- 1) Označte všetky svoje skúmavky vašim súťažným číslom a jednotlivo písmenami S, I, T podľa príslušnej teploty inkubácie (S – studená, I – izbová, T – teplá)
- 2) Napipetujte do každej skúmavky 2 ml zemiakového extraktu a pridajte 5 kvapiek roztoku saponátu. Opatrne premiešajte pohybom skúmavky tak, aby sa nevytvorili bubliny.
- 3) Inkubujte skúmavky 5 minút pri rôznych teplotách.
- 4) Rýchlo pridajte do každej skúmavky 1 ml 3 % H_2O_2 opäť opatrne premiešajte a pokračujte v inkubácii pri danej teplote ďalších 10 minút. Počas inkubácie odmerajte a zapíšte teplotu jednotlivých kúpeľov.
- 5) Vyberte skúmavky z vody, osušte ich a na zvislo stojacich skúmavkách si fixkou označte výšku hladiny reakčnej zmesi a výšku peny. Odmerajte a zapíšte ich vzdialenosť v mm.

Výsledky

	studená	izbová	teplá
Teplota (°C)			
Výška peny (mm)			

Úlohy

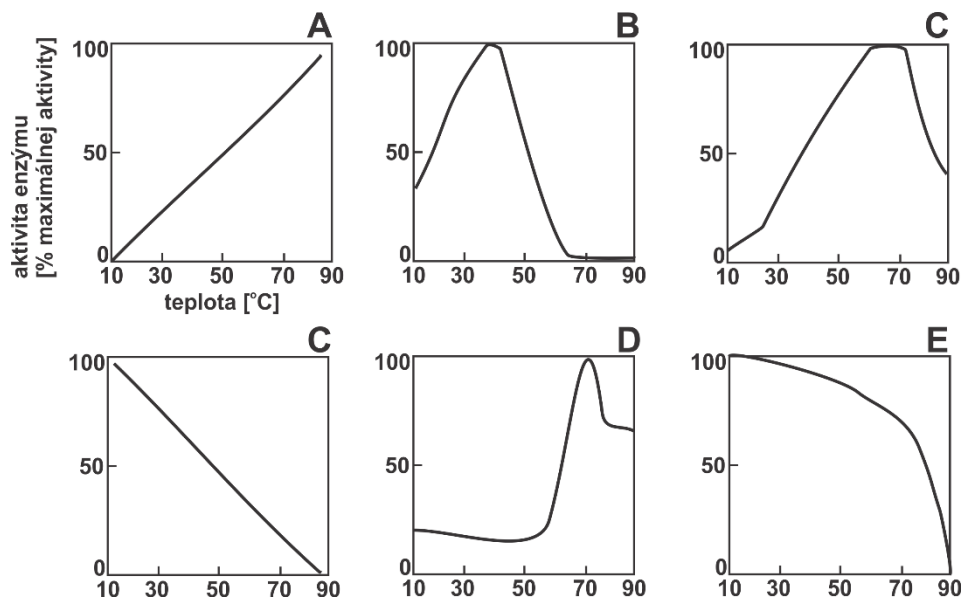
1) Označte „+“ ten/tie z nasledujúcich faktorov, ktorými je možné vysvetliť rozdiel pozorovaný medzi vzorkou inkubovanou pri izbovej teplote a chladenou vzorkou. Ostatné možnosti označte „-“.

zvýšená rýchlosť difúzie častíc	
zvýšená rýchlosť osmózy	
zmeny v priestorovej štruktúre enzýmu	
prítomnosť iných antioxidantných enzýmov	
prítomnosť škrobu	

2) Označte „+“ ten/tie z nasledujúcich faktorov, ktorými je možné vysvetliť rozdiel pozorovaný medzi vzorkou inkubovanou pri izbovej teplote a zahrievanou vzorkou. Ostatné možnosti označte „-“.

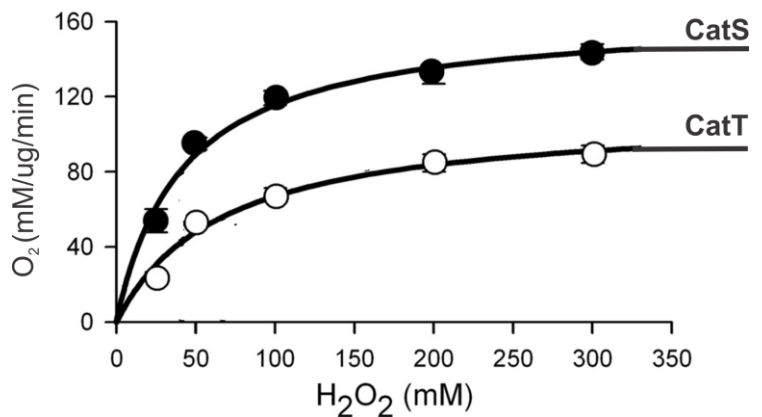
zvýšená rýchlosť difúzie častíc	
zvýšená rýchlosť osmózy	
zmeny v priestorovej štruktúre enzýmu	
prítomnosť iných antioxidantných enzýmov	
prítomnosť škrobu	

3) Predstavte si, že ste urobili podobné meranie s katalázou dvoch baktérií – *Escherichia coli*, bežne žijúcej v ľudských črevách a *Thermus aquaticus* z horúcich prameňov. Pre každú z týchto baktérií vyberte najpravdepodobnejší graf závislosti aktivity jej katalázy na teplote.



<i>Escherichia coli</i>	
<i>Thermus aquaticus</i>	

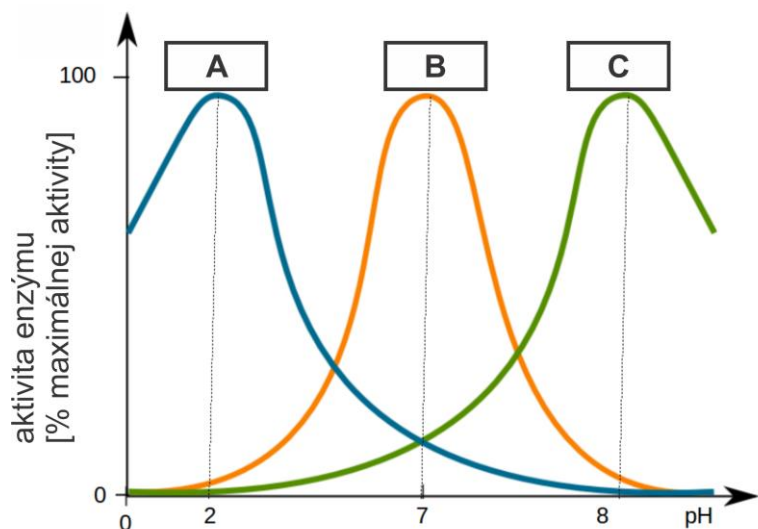
4) Rýchlosť enzymatickej reakcie ovplyvňuje nielen teplota, ale aj iné faktory, Na obrázku vidíte napríklad vplyv koncentrácie substrátu na rýchlosť reakcie katalyzovanej katalázou komára *Anopheles gambiae*. Tento druh komára ma dve katalázy, CatS a CatT, ktoré sú dôležité pre prežívanie jeho vajíčok. Reakčná rýchlosť je vyjadrená ako množstvo vznikajúceho kyslíka na μg enzýmu za minútu.



Na základe grafu označte v tabuľke pravdivé tvrdenia „+“, ostatné tvrdenia označte „-“.

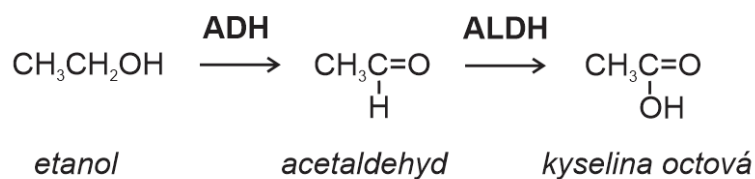
CatS viaže peroxid vodíka lepšie ako CatT.	
Ak do dvoch roztokov peroxidu vodíka s koncentráciou 350 mmol/l pridáme rovnaké množstvá CatS, respektíve CatT, substrát sa rýchlejšie spotrebuje v prítomnosti CatS.	
Vajíčka komára ovplyvnené inhibítorom CatT sa nevyliahnú.	
Pri koncentráciách substrátu nad 350 mmol/l môžeme reakčnú rýchlosť pre oba enzýmy zvýšiť zahriatím.	
Znefunkčnenie enzýmu CatS, bude mať pravdepodobne miernejší prejav, ako znefunkčnenie CatT.	
Pri koncentrácii peroxidu vodíka väčšej ako 300 mmol/l boli aktívne miesta všetkých molekúl CatS v danej reakcii obsadené substrátom.	

5) Ďalším faktorom, ktorý vplýva na aktivitu enzýmov je pH. Napríklad rôzne tráviace enzýmy človeka majú rôzne pH optimá, čo u niektorých z nich pomáha zabrániť predčasnej aktivácii. Na grafe vidíte závislosť aktivity na pH prostredia pre slinnú amylázu, pepsín a trypsín. Určte pre každý enzým zodpovedajúci graf.



slinná amyláza	
pepsín	
trypsín	

6) Pre mnohé enzýmy boli identifikované inhibítory, ktoré sa štruktúrou podobajú na substráty a viažu sa na aktívne miesto, ale reakcia s nimi ďalej neprebieha. Jedným typom inhibítorov sú tzv. kompetitívne inhibítory, ktoré, ak sa pridajú do reakcie, „súťažia“ so substrátom o väzbu na aktívne miesto. Znižujú teda reakčnú rýchlosť, ale ich efekt je možné vyvážiť pridaním substrátu. Niektoré enzýmy sú tiež schopné katalyzovať rovnakú reakciu s viacerými rôznymi substrátmi. Zaujímavým medicínsky relevantným príkladom sú enzýmy metabolizmu alkoholu, ktoré slúžia na degradáciu etanolu, vznikajúceho pri chemických procesoch v tele. Alkoholdehydrogenáza (ADH) mení etanol na mierne toxický acetaldehyd, ktorý spôsobuje mnohé z negatívnych príznakov po požití väčšieho množstva alkoholu (napr. bolesť hlavy a zvracanie). Acetaldehyd je ďalej metabolizovaný enzýmom aldehyddehydrogenázou (ALDH) na kyselinu octovú (pozri schému).



Ak však človek požije iný alkohol, ADH ho dokáže premeniť na prílišný aldehyd a ALDH tento aldehyd ďalej mení na kyselinu. Napríklad po požití metanolu vzniká veľmi toxický formaldehyd a ďalej sa metabolizuje na tiež toxickú kyselinu mravčiu. Tieto dva medzi produkty sú zodpovedné za vážne príznaky otravy metanolom. Na liečbu akútnej otravy metanolom sa používa látka 4-metylpyrazol (4MP), ktorá je kompetitívnym inhibítom ADH. Jej podávanie teda zabraňuje ADH metabolizovať metanol a poskytuje telu dostatok času na jeho vylúčenie močom.

Aj keď sú rôzne látky (v prípade ADH etanol, metanol a 4MP) schopné viazať sa na aktívne miesto enzýmu, spravidla sa neviažu rovnako dobre. Pre tieto tri látky napríklad platí, že etanol sa na ADH viaže asi 5000x lepšie ako metanol a 4MP sa viaže približne 100x lepšie ako etanol.

Na základe informácií z predchádzajúceho textu rozhodnite, či sú nasledujúce tvrdenia pravdivé „+“, alebo nie „-“. Ak nie je možné rozhodnúť o pravdivosti tvrdenia, tiež ho označte „-“.

Ak nie je k dispozícii 4MP, je možné liečiť otravu metanolom podávaním etanolu.	
Ak po požití etanolu pacient užije 4MP, znížia sa nepríjemné vedľajšie účinky, pretože acetaldehyd bude vznikať pomalšie, a ALDH bude mať dostatok času na jeho degradáciu.	
Pri otrave metanolom nezávisí výsledok liečby od času medzi užitím metanolu a podaním 4MP	
Lieky na liečbu chronického alkoholizmu, ktoré majú za cieľ znechutiť pacientovi konzumáciu alkoholu, by mohli byť inhibítormi ALDH.	
Otravu etanolom je možné liečiť podávaním malých dávok metanolu.	

Autor: Mgr. Jaroslav Ferenc

Recenzia: Mgr. Katarína Juríková, PhD.