

Praktická úloha č. 1 (60 minút, 40 bodov)

Téma: Biochémia - Enzymatické reakcie

Všetky známe živé organizmy na Zemi sú závislé od enzýmov. V tejto úlohe sa zameriame na enzýmy zo skupiny polyfenoloxidáz, ktoré sú časté v rastlinách, kde majú obranné funkcie. Ak sa pletivo poškodí, dôjde k oxidácii fenolických zlúčenín týmito enzýmami a výsledkom je hnedé sfarbenie – preto túto reakciu môžeme ľahko pozorovať. Keďže sa aktivita polyfenoloxidáz prejavuje zmenou farby, je aj ekonomicky významná, pretože stmavnuté ovocie a zelenina sú menej atraktívne pre spotrebiteľov.

Praktická úloha: Inhibícia polyfenoloxidázy v šupe banánu

Často používanou látkou na zabránenie hnednutia je kyselina citrónová. Mohli by sme preto navrhnúť, že kyslé pH inhibuje aktivitu polyfenoloxidázy. Kyselina citrónová je však zároveň chelačné činidlo, t. j. dokáže viazať ióny kovov. Keďže pre fungovanie polyfenoloxidáz sú potrebné meďnaté kationy v ich aktívnom centre, kyselina citrónová by preto mohla enzým znefunkčniť práve vychytávaním týchto iónov. V tejto úlohe urobíte jednoduchý pokus, pomocou ktorého sa pokúsíte tieto dva mechanizmy odlíšiť. Porovnáte rýchlosť hnednutia po ovplyvnení roztokom 1% kyseliny citrónovej a 0,01 % kyseliny chlorovodíkovej, ktoré majú približne rovnaké pH. Okrem toho ešte porovnáte priebeh reakcie aj pri použití koncentrovanejšieho roztoku HCl.

Pomôcky a materiál: cca. 1,5 cm hrubý priečny rez banánu, 4 špáradlá, destilovaná voda, 1 % roztok kyseliny citrónovej, 1 % a 0,01 % roztok kyseliny chlorovodíkovej, kvapkadlo (alebo sklenená tyčinka) pre každý roztok, Petriho miska alebo iná podložka

Postup:

1. Odstráňte šupu z rezu banánu a položte ju do Petriho misky vonkajšou stranou navrch
2. Z každého z pripravených roztokov kvapnite na šupu jednu v priemere asi 0,5 cm veľkú kvapku. Dávajte pozor aby boli kvapky približne rovnako veľké a v dostatočných rozstupoch, aby sa nezmiešali. Zaznamenajte si poradie roztokov.
3. Pre každú kvapku prepichujte šupu viackrát špáradlom až kým sa nevsiakne. Pokúste sa tento krok urobiť čo najrýchlejšie za sebou, aby bol začiatok reakcie pre všetky podmienky porovnateľný.
4. Vyhodnoťte farebné zmeny po 5 a 10 minútach od začiatku reakcie.

Výsledky:

1) S použitím nasledujúcej tabuľky vyhodnoťte farebné zmeny po 5 a 10 minútach. Pre každý sledovaný čas označte krížikom jeden riadok, ktorý najlepšie vystihuje vami pozorovanú zmenu.

čas	odpoveď	dest. voda	1 % HCl	0,01 % HCl	1% k. citrónová
5 minút		●	●	●	●
		●	●	●	●
		●	●	●	●
		●	●	●	●
		●	●	●	●
		●	●	●	●
10 minút		●	●	●	●
		●	●	●	●
		●	●	●	●
		●	●	●	●
		●	●	●	●
		●	●	●	●

2) Zhodnoťte nasledujúce tvrdenia na základe získaných výsledkov. Ak je možné dané tvrdenie vysloviť na základe vašich výsledkov, označte ho znamienkom "+", ostatné tvrdenia označte "-".

Použitá koncentrácia kyseliny citrónovej bola dostatočná na úplnú inhibíciu polyfenoloxidázy.	
Pri porovnateľnom pH je kyselina citrónová lepší inhibitor polyfenoloxidázy	

ako HCl, čo môže byť spôsobené jej chelačnými schopnosťami.	
Polyfenoloxidáza bola najúčinnnejšie inhibovaná roztokom s najnižším pH.	
Optimálne pH pre aktivitu polyfenoloxidázy v banánovej šupke je 8.	

Doplňujúce úlohy

3) 0,01 % roztok kyseliny chlorovodíkovej má pH približne 2,5. Aké je potom približné pH jej 1% roztoku?

- A. 0,5
- B. 1
- C. 5
- D. 10

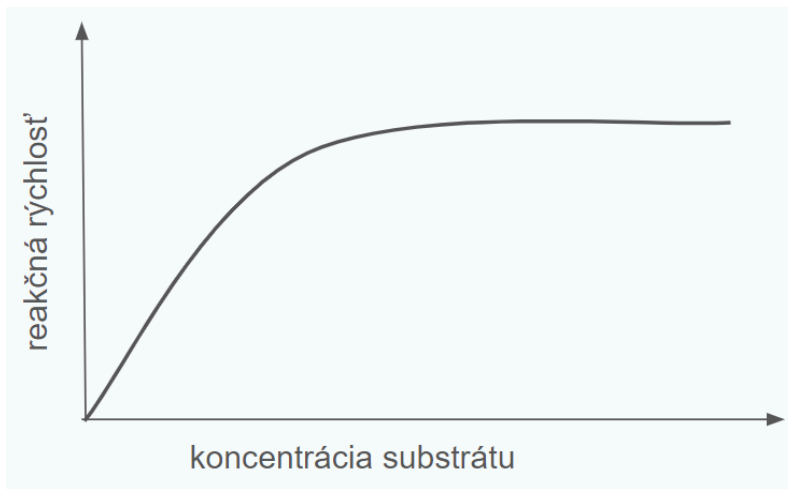
4) Ako už bolo spomenuté, aby došlo k vzniku hnedých produktov účinkom polyfenoloxidáz, zvyčajne musí byť pletivo mechanicky poškodené. Keďže je známe, že fenolické substráty tejto reakcie sa nachádzajú vo vakuolách, mohli by sme predpokladať, že samotné enzýmy sa nachádzajú v inej časti bunky a k ich kontaktu so substrátmi dôjde iba pri jej poškodení. Aby ste zistili, kde v rastlinných bunkách sa polyfenoloxidázy nachádzajú, izolovali ste z nich jednotlivé organely a v získaných vzorkách O1 – O4 ste sledovali prítomnosť polyfenoloxidázy a iných typických enzýmov. Výsledky vidíte v tabuľke nižšie.

enzým	O1	O2	O3	O4
polyfenoloxidáza	+	+	-	-
RuBisCO	+	-	-	-
citrát syntáza	-	+	-	-
7-dehydrocholesterol reduktáza	-	-	+	-
RNA polymeráza II	-	-	-	+

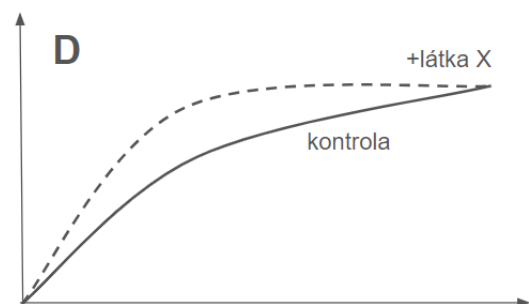
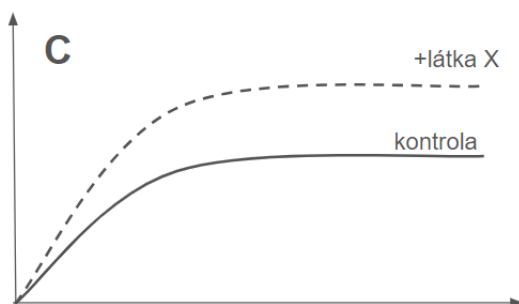
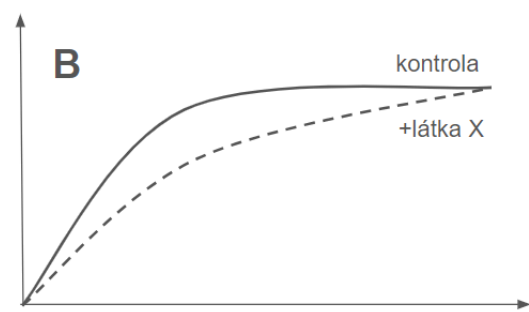
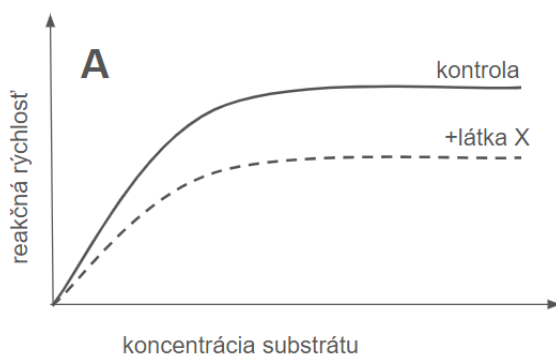
Ktoré organely v tomto experimente obsahovali polyfenoloxidázy (označte všetky správne možnosti)?

- A. chloroplasty
- B. mitochondrie
- C. endoplazmatické retikulum
- D. jadro

5) Pri pridávaní substrátu do enzymatickej reakcie sa reakčná rýchlosť zvyšuje, až kým nie sú všetky molekuly enzýmu obsadené. Vtedy sa dosiahne maximálna reakčná rýchlosť. Závislosť reakčnej rýchlosti od koncentrácie substrátu vidíte na grafe nižšie.



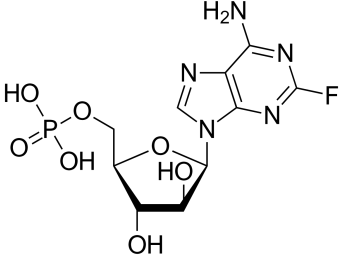
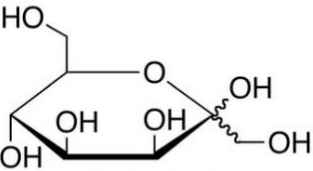
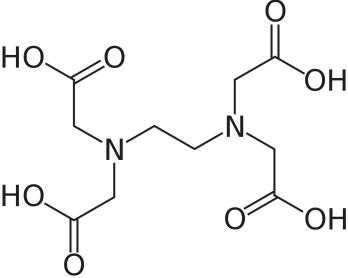
Ak však do reakcie pridáme inhibítor, tvar tejto krivky sa zmení. Inhibítory majú rôzne mechanizmy fungovania. Niektoré z nich natrvalo znefunkčnia molekuly enzýmu, kým iné súťažia o aktívne miesta so substrátom. Prítomnosť týchto druhov inhibítorov sa prejaví rôznymi zmenami krivky reakčnej rýchlosti. Nasledujúce grafy (A – D) zobrazujú potenciálne výsledky merania reakčnej rýchlosti po pridaní rôznych látok, z ktorých niektoré sú inhibítory. Kontrolná reakcia je znázornená plnou čiarou, kým reakcia s pridaním neznámej látky prerušovanou čiarou.



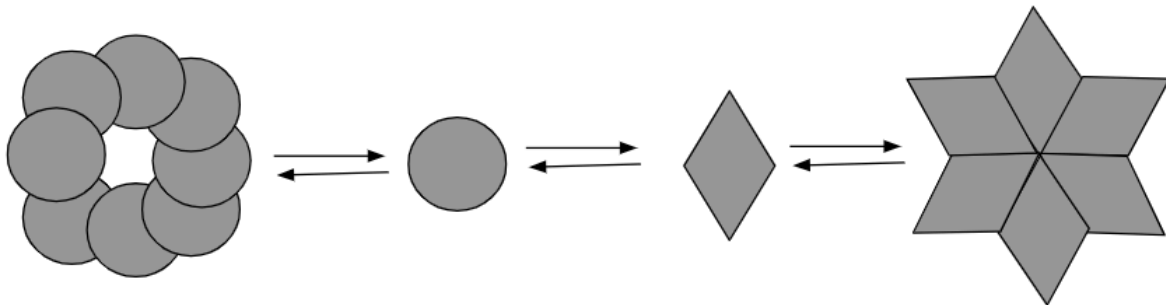
Ktorý z grafov predstavuje výsledok experimentu po pridaní inhibítora súťažiaceho so substrátom?

6) Ako už bolo spomenuté, polyfenoloxidázy sú závislé na meďnatých katiónoch v aktívnom centre a je možné ich inhibovať chelačnými činidlami, ktoré tieto ióny vychytávajú. Veľmi účinným chelačným činidlom je látka nazývaná EDTA (kyselina etyléndiamíntetraoctová). Ktorý z grafov v úlohe 5 by ste očakávali ako výsledok experimentu, kde pridanou látkou je EDTA? odpoveď:

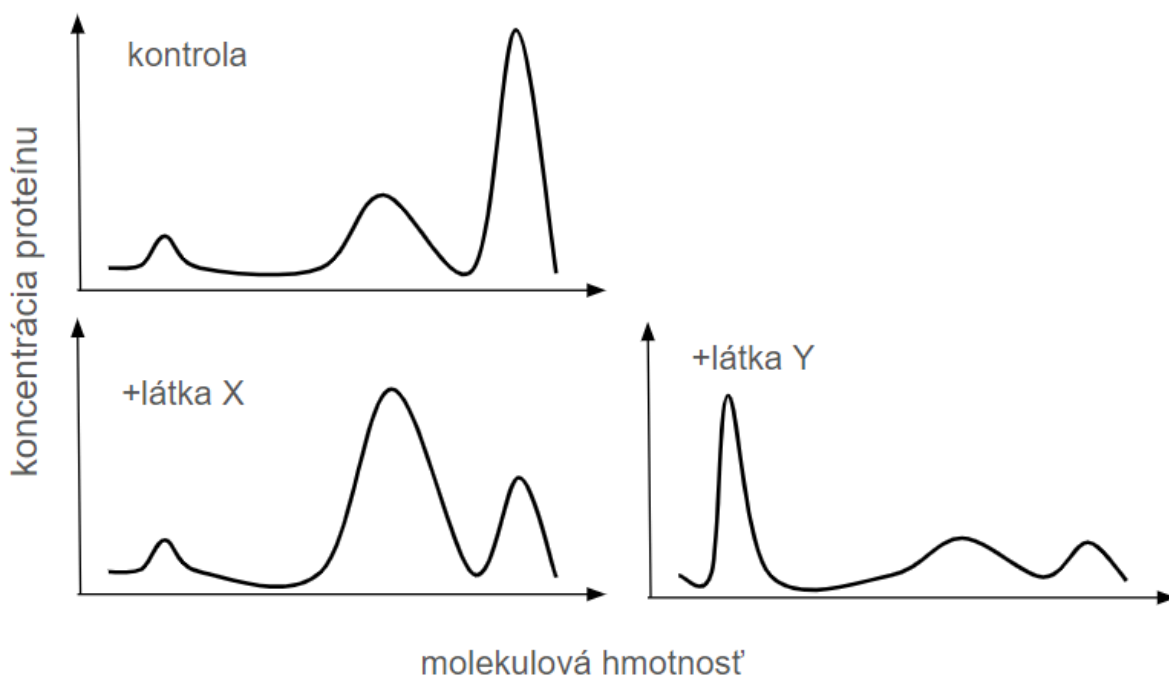
7) V nasledujúcej tabuľke vidíte páry niektorých enzýmov so vzorcami ich známych inhibítorov. Uvažujte o štruktúre substrátov daného enzýmu a zakrúžkujte pre každý pár enzým-inhibítor, či je pravdepodobnejšie, že daný inhibítor súťaží alebo nesúťaží so substrátom o väzbu na aktívne miesto.

enzým	inhibítor	odpoveď
DNA polymeráza		súťaží / nesúťaží
glukokináza		súťaží / nesúťaží
RNA polymeráza		súťaží / nesúťaží
cytochrómoxidáza	KCN	súťaží / nesúťaží
alkoholdehydrogenáza	BiCl ₃	súťaží / nesúťaží

8) Pre aktivitu mnohých enzýmov je dôležitá ich kvartérna štruktúra, pretože vytvárajú homooligoméry – komplexy viacerých identických molekúl daného enzýmu. Zaujímavým príkladom regulácie aktivity enzýmov prostredníctvom ich kvartérnej štruktúry je pomerne nedávno objavený fenomén morfeínov. Morfeíny sú proteíny, ktoré môžu prepínať medzi dvoma stabilnými konformáciami ako monoméry. Tieto dva monoméry zároveň dávajú vzniknúť oligomérom s inými vlastnosťami. Na obrázku nižšie vidíte schematický príklad morfeínu, ktorého dva oligoméry (zobrazené ako kruh a kosoštvorec) umožňujú prepínanie medzi hexamérom a oktamérom.



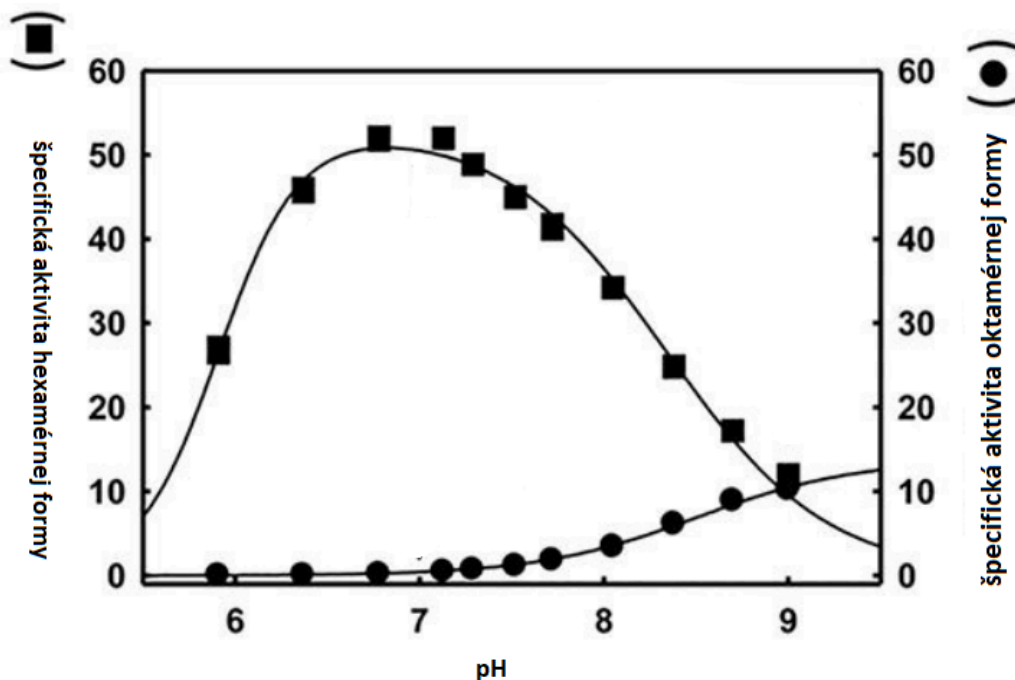
V bunkách regulácia morfeínov funguje najčastejšie tak, že prepínanie medzi formami je riadené väzbou malých molekúl (napr. metabolitov). Predstavte si, že ste testovali ako dve látky, X a Y, ovplyvňujú prepínanie medzi formami morfeínu z predchádzajúceho obrázku. Výsledky experimentu vidíte na grafoch nižšie, ktoré zobrazujú kvantitatívne chromatogramy morfeínových foriem separovaných na základe molekulovej hmotnosti. V tabuľke označte "+" tie tvrdenia, ktoré môžete vysloviť na základe získaných výsledkov. Ostatné tvrdenia označte "-".



Látka X stabilizuje oktamér	
Látka X stabilizuje hexamér	
Za štandardných podmienok sa daný morfeín vyskytuje prevažne vo forme oktaméru	
Monoméry tohto morfeínu sa líšia molekulovou hmotnosťou	
Látka Y destabilizuje hexamér	
Látka Y destabilizuje oktamér	

9) Rovnováhu medzi morfeínovými formami môžu ovplyvniť aj genetické mutácie. Jedným zo známych morfeínov je enzým porfobilinogén syntáza (PBGS), ktorá je dôležitá pre metabolizmus hemoglobínu a vyskytuje sa ako hexamér alebo oktamér. Mutácie znefunkčujúce tento enzým sú príčinou niektorých foriem porfýrie. Zistilo sa, že hexamérna a oktamérna forma majú iné katalytické vlastnosti, pričom niektoré z mutácií zodpovedných za porfýriu menia ich zastúpenie v bunkách. V nasledujúcom grafe vidíte závislosť aktivity týchto dvoch foriem od pH. Hexamérna forma je označená štvorčekmi a oktamérna krúžkami. Aktivita enzýmov je vyjadrená ako μM produktu na miligram proteínu za minútu.

Na základe grafu a predchádzajúceho textu rozhodnite o pravdivosti nasledujúcich tvrdení. Pravdivé tvrdenia označte "+" a ostatné tvrdenia označte "-".



Oktamérna a hexamérna forma majú pri pH 9 porovnateľnú aktivitu	
Mutácie, ktoré spôsobujú porfýriu, zvyšujú zastúpenie oktamérnej formy	
Za fyziologických podmienok môže bunka znížiť aktivitu PBGS prepnutím na oktamérnu formu	
Optimálne pH pre aktivitu oboch foriem je 6	
Za fyziologických podmienok pochádza väčšina enzýmovej aktivity PBGS v normálnych bunkách z oktamérnej formy	

Po skončení krajského kola Vás radi privítame v spoločnej diskusii o úlohách na platforme Discord, na serveri "Biologická olympiáda". Link nájdete v autorských riešeniach.