

Küsimus 26. Glükoosi ja palmitaadi oksüdatsioon

Küsimusele vastamiseks tuleks kõigepealt välja kirjutada, kui mitu molekuli makroergilisi ühendeid - ATP, NADH_2 ja FADH_2 - tekib i) 1 molekuli glükoosi ja ii) 1 molekuli palmitaadi täielikul oksüdeerimisel läbi i) glükolüüsi ja tsitraaditsükli (glükoos) või ii) β -oksüdatsiooni ja tsitraaditsükli (palmitaat). Lisaks tuleb arvestada, et 1 glükoosi molekuli lagundamine glükolüüsi käigus tekitab 2 molekuli püruvaati, millest moodustub 2 molekuli Ac-CoA-d. Need 2 Ac-CoA molekuli sisenevadki tsitraaditsükklisse. Bilanss oleks järgmine :

Glükoos:

Glükolüüsis :

1 glükoosi kohta

2 ATP

3 NADH_2

Tsitraaditsükklis :

1 Ac-CoA kohta

1 ATP

3 NADH_2

1 FADH_2

2 Ac-CoA kohta

2 ATP

6 NADH_2

2 FADH_2

Summaarselt : glükolüüs + tsitraaditsükkel:

1 glükoosi kohta

4 ATP

9 NADH_2

2 FADH_2

Palmitaat : β -oksüdatsioonil :**1 palmitaadi kohta**

8 Ac-CoA

7 NADH₂7 FADH₂

Kõik 8 Ac-CoA molekuli sisenevad tsitraaditsükklisse

Tsitraaditsükklis :**1 Ac-CoA kohta**

1 ATP

3 NADH₂1 FADH₂**8 Ac-CoA kohta**

8 ATP

24 NADH₂8 FADH₂Summaarselt : β -oksüdatsioon + tsitraaditsükkel :**1 palmitaadi kohta**

8 ATP

31 NADH₂15 FADH₂

Kui see tehtud, tuleb leida, mitu ATP molekuli on hingamisahelas võimalik saada 1 NADH₂ ja 1 FADH₂ molekulist. Selleks arvutuseks on küsimuse tekstis toodud järgmine info :

- 1 NADH₂ oksüdeerimisel transporditakse mitokondri sisemusest välja 10 H⁺ - iooni
- 1 FADH₂ oksüdeerimisel transporditakse mitokondri sisemusest välja 6 H⁺ - iooni
- Mitokondri sisemusest välja transporditud prootonite tagasitranspordil mitokondri sisemusse läbi ATP

süntaasi sünteesitakse iga 3 siseneva H^+ -iooni kohta 1 molekul ATP-d

Selle info põhjal saame arvutada, mitu ATP molekuli vastab 1 $NADH_2$ ja 1 $FADH_2$ molekulile :

- 1 $NADH_2 \rightarrow 10 H^+$ iooni $\rightarrow 10 (H^+) / 3 (H^+ \text{ ATP kohta}) \approx$
3 ATP

- 1 $FADH_2 \rightarrow 6 H^+$ iooni $\rightarrow 6 (H^+) / 3 (H^+ \text{ ATP kohta}) \approx$
2 ATP

Seega : 1 $NADH_2 = 3 \text{ ATP}$

1 $FADH_2 = 2 \text{ ATP}$

Nüüd saame glükoosi ja palmitaadi osküdatsoonil tekkinud makroergilised ühendid väljendada täielikult ATP kaudu :

Glükoos :

Summaarselt : glükolüüs + tsitraaditsükkel:

1 glükoosi kohta

4 ATP	= 4 ATP
9 $NADH_2$	= 27 ATP
2 $FADH_2$	= 4 ATP
<hr/>	
Kokku	= 35 ATP

Palmitaat :

Summaarselt : β -oksüdatsioon + tsitraaditsükkel :

1 palmitaadi kohta

8 ATP	= 8 ATP
31 NADH ₂	= 93 ATP
<u>15 FADH₂</u>	<u>= 30 ATP</u>
Kokku	= 131 ATP

Seega :

1 glükoosi molekuli täielik oksüdatsioon - 35 ATP-d

1 palmitaadi molekuli täielik oksüdatsioon - 131 ATP-d

Järelikult 1 mooli palmitaadi oksüdatsioonil saadakse 1 mooli glükoosi oksüdatsiooniga võrreldes ATP-d suhtes :

$$131 : 35$$

Nüüd jääb veel üle minna moolidelt grammidele, sest ülesandes küsiti, milline oleks see suhe ATP toodangus 1 grammi palmitaadi ja 1 grammi glükoosi oksüdatsiooni võrdluses. Selleks olid antud glükoosi ja palmitaadi molekulmassid :

1 mool glükoosi - 160 g glükoosi

1 mool palmitaati - 286 g palmitaati

Seega

286 g (= 1 mool) palmitaati - 131 ATP

160 g (= 1 mool) glükoosi - 35 ATP

Mina isiklikult arvutaks nüüd nii: 1 mool ehk 160 g glükoosi annab 35 mooli ATP-d. 1 mooli palmitaadiga kaalult võrdne kogus glükoosi ehk 286 g annaks ju $286/160 = 1,79$ korda rohkem ATP-d ehk ligi 63 molekuli ATP-d. Seetõttu

286 g palmitaati - 131 ATP-d

286 g glükoosi - 63 ATP-d

Nüüd teame me ju, millises suhtes tekib ATP-d kaalult võrdsete koguste palmitaadi ja glükoosi oksüdatsioonil. Selleks suhteks on

$$131 : 63 = 72 : 35$$

See suhe kehtib nii 286 g kui 1 g palmitaadi ja glükoosi korral - peaasi, et mõlemat ühendit oleks kaalult võrdses koguses.

Küsimus 27. Restriktaasi *Xho I* eraldamine erinevate meetoditega

Selles ülesandes oli kõige olulisem aru saada, et erineval teel (=erinevaid puhastamismetoodikaid kasutades) saadud ensüümipreparatsioonidest on kõige töövõimelisem (aktiivsem) see preparatsioon, mille puhul sama koguse produkti tootmiseks või lähteaine ära kulutamiseks piisab kõige väiksemast kogusest ensüümist. Selgitame seda näite varal. Oletame, et mingi ensüümi kaks erinevat preparatsiooni P1 ja P2 toodavad 1 minuti jooksul võrdse koguse - 100 mg reaktsiooniproducti. Oletame samuti, et selle koguse produkti tootmiseks on preparatsiooni P1 vaja 10 mg, preparatsiooni P2 aga 50 mg. Siis on P1 ju 5 korda aktiivsem (töövõimelisem) kui P2, sest sama hulga produkti toodab preparatsiooni P1 5 korda väiksem kogus võrreldes P2-ga (10 mg *versus* 50 mg).

Tabelis 1 oli ära toodud iga eraldamismeetodiga saadud ensüümi *Xho I* preparatsiooni kogus (μ g). Samuti oli tabelis

esitatud erinevate *Xho* I preparatsioonidega töötlemisel alles jäänud lähteühendi - faagi λ DNA - kogus (μg).

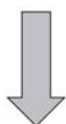
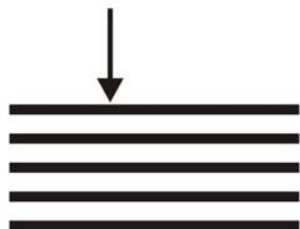
Arvan, et kõige lihtsam oleks siin toimida nii. Algselt oli λ DNA-d kõigi ensüümipreparatsioonide testimisel 1 μg . Kui nüüd sellest 1 μg DNA kogusest maha lahutada see hulk, mis jäi pärast reaktsiooni alles (tabelis), leiame, kui mitu μg produkti tekkis restriктаasi töö tulemusena. Nüüd tuleb produkti kogus läbi jagada ensüümi kogusega - kõige suurema väärtusega suhe näitabki kõige aktiivsemat ensüümipreparatsiooni. Tegin arvutuse näitlikustamiseks tabeli :

Meetod	Ensüüm (μg)	Produkt = 1 - allesjäänud lähteaine (μg)	μg produkti/ μg ensüüm
A	25	$1 - 0,2 = 0,8$	$0,8 : 25 = 0,032$
B	17	$1 - 0,3 = 0,7$	$0,7 : 17 = 0,041$
C	8	$1 - 0,9 = 0,1$	$0,1 : 8 = 0,0125$
D	10	$1 - 0,6 = 0,4$	$0,4 : 10 = 0,04$
E	35	$1 - 0,8 = 0,2$	$0,2 = 0,0057$

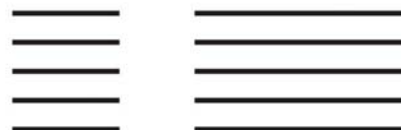
Seega kõige suurema aktiivsusega ensüümi preparatsiooni andis puhastamismeetod **B**. Kogu juttu aitab loodetavasti natukene selgiatada alljärgnev joonis :

Lähteaine - faagi λ DNA
1 μg

Xho I lõikekoht



Produkt - lõigatud DNA
x μg

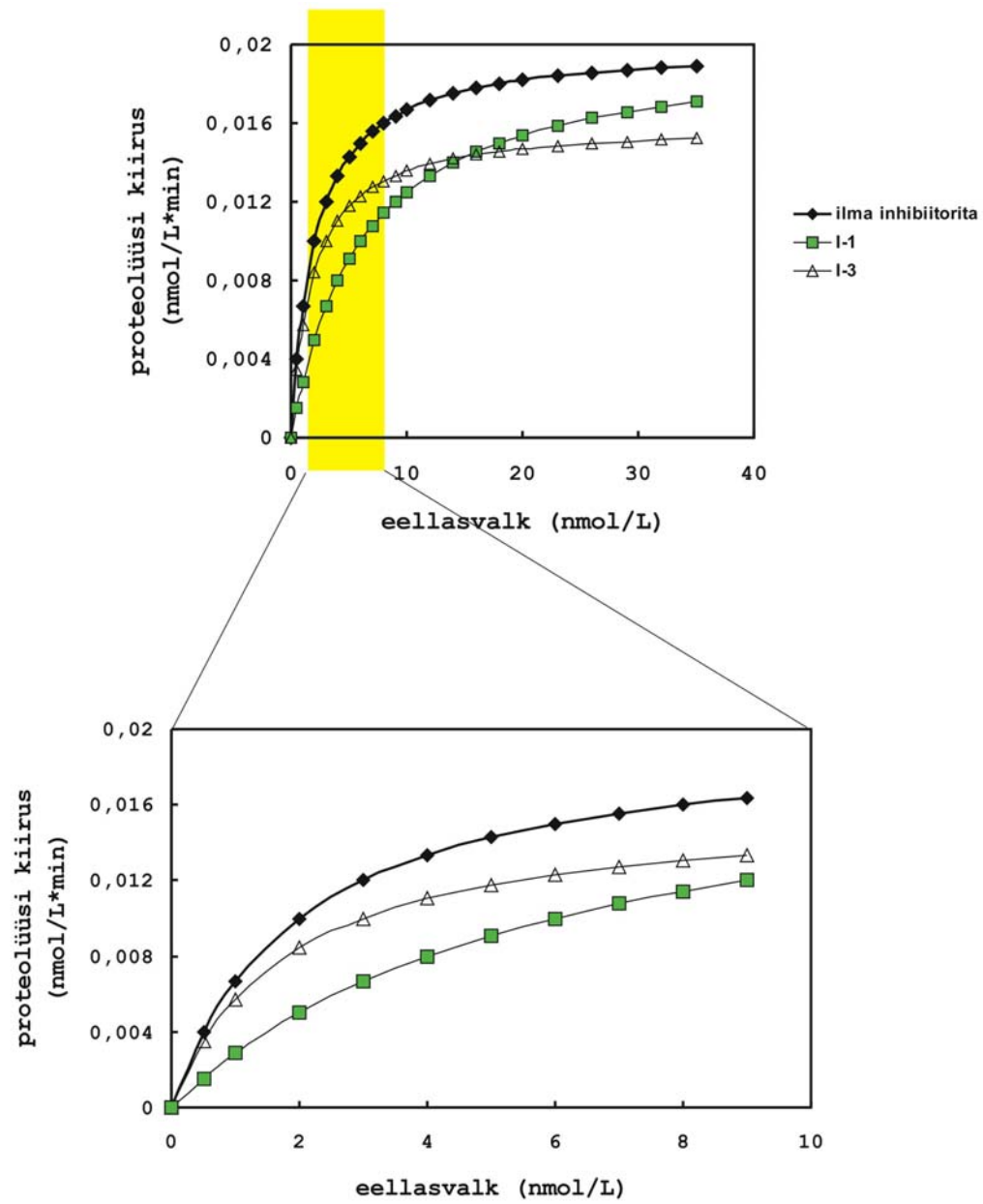


Lähteaine - faagi λ DNA
1 - x μg

Küsimus 28. HIV proteaasi inhibiitorid

Sellele küsimusele vastamiseks oli oluline osata kokku panna tabeli 2 ja joonise 9 andmed. Nagu küsimuse tekstist aru oli saada, toimub eellasvalgu gp160 proteolüütiline lõikamine HIV proteaasi poolt peremeesraku sees. Järelikult peab proteaasi inhibiitor esimese asjana suutma võimalikult efektiivselt peremeesraku siseneda. Tabelist 2 on näha, et 4 erinevast inhibiitorist suudavad efektiivselt raku siseneda vaid 2 tükki - **I-1** (efektiivsus 60 %) ja **I-3** (efektiivsus 80 %). Seega oleme ainuüksi tabeli 2 põhjal 4 algsest inhibiitorist 2 välistanud (I-2 ja I-4). Nüüd tuleb kindlaks teha, milline neist 2 raku efektiivselt sisenevast inhibiitorist HIV proteaasi kõige edukamalt

inhibeerib (= takistab gp160 protsessimist). Selleks tuleb lähtuda joonis 9 andmetest. Inhibiitor on seda parem, mida rohkem tema juuresolekul ensüümi poolt katalüüsitava reaktsiooni kiirus langeb. Joonisel on toodud gp160 eellasvalgu proteolüütilise lõikamise kiiruse sõltuvus gp160 kontsentratsioonist 4 erineva inhibiitori juuresolekul. Et me tabeli 2 põhjal välistasime inhibiitorid I-2 ja I-4, tuleb tegelikult võrrelda ainult I-1 ja I-3 mõju proteolüüsi kiirusele. Nagu jooniselt 9 näha, alandab inhibiitor I-1 valgu gp160 lõikamist HIV proteaasi poolt rohkem kui inhibiitor I-3. Täpsemalt - inhibiitor I-1 on I-3-st efektiivsem gp160 selliste kontsentratsioonide juures, mis vastavad gp160 kontsentratsioonile rakus. Seetõttu on kõige efektiivsemaks inhibiitoriks I-1. Vaata ka juuresolevat joonist.



Küsimus 29. DNA polümeraas III mutandid

DNA molekuli paljundamine enne raku jagunemist on ülioluline mistahes organismi eluvõimelisuse seisukohalt, sest üksnes tervikliku DNA molekuli abil on võimalik järglasrakkudele edasi anda kogu eluks vajalik pärilik informatsioon. Nagu küsimuse 29 juures olevast tekstist selgub, iseloomustab bakteris *Escherichia coli* DNA-d paljundavat ensüümi DNA polümeraas III suur protsessiivsuse - võime ühe ja sama DNA vanemmolekuli pealt „ära kukkumata“ pikendada uut DNA ahelat sadade tuhandete nukleotiidide ulatuses. DNA polümeraas III protsessiivsuse vähenemine näiteks mutatsioonide tõttu viib häireteni DNA paljundamises ja järelikult alandab rakkude eluvõimet. Küsimuses 29 viidigi DNA polümeraasi III sisse 4 erinevat mutatsiooni ja jälgiti i) milline on nende mutantsete DNA polümeraaside protsessiivsuse ja ii) neid polümeraase sisaldavate rakkude eluvõime. DNA polümeraas III protsessiivsuse mõõtmiseks lasti metsiktüüpi (s.t. muteerimata) ja 4 mutantsetel DNA polümeraas III-l sünteesida DNA molekule 5000 aluspaari pikkuselt geenilt. Sünteesitud DNA molekulide pikkust aluspaarides hinnati agarosgeel elektroforeesil, mis võimaldab lahutada DNA molekule nende pikkuse järgi (sama asi, mis molekulaarbioloogia praktilises töös). Et sünteesitav DNA on 5000 aluspaari pikk, siis metsiktüüpi polümeraas sünteesiski uue DNA molekuli pikkusega 5000 aluspaari (oleks võinud sünteesida 100 korda pikemagi DNA, ainult et paljundatav geen sai enne otsa). Osad mutantsed DNA polümeraasid sünteesisid seevastu lühemaid DNA molekule. See tähendab, et mutatsioon polümeraasis vähendas tema protsessiivsust - ensüüm „kukkus“ enne DNA vanemmolekuli pealt ära, kui täispika

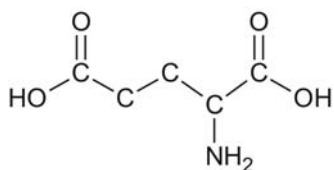
geeni replitseerida suutis. Siiski oli ka nende mutatsioonide mõju raskusaste erinev - mõni mutantne DNA polümeraas suutis lisaks lühematele DNA molekulide sünteesida ka täispika uue DNA. Ühe mutandi korral oli sünteesitud DNA molekul sama pikk kui metsiktüübi korral - järelilikult see mutatsioon protsessiivsust ei mõjutanud. DNA paljundamise suure tähtsuse tõttu raku eluvõimele võib oletada, et mida enam oli häiritud polümeraasi DNA paljundamise võime (protsessiivsus), seda väiksem on sellist mutantset polümeraasi sisaldavate rakkude eluvõime. Bakteriraku eluvõimet mõõdetakse tavapäraselt selle järgi, kuidas 1 bakterikolooniaga nakatatud=inokuleeritud bakterikultuuri tihedus (= pooldumise teel juurde tekkinud rakkude arv) aja jooksul kasvab. Nagu jooniselt 12 näha, kasvas enamiku mutantset DNA polümeraasi sisaldavate *E.coli* rakkude tihedus metsiktüüpi polümeraasi sisaldavatest rakkudest aeglasemalt. Jooniste 11 ja 12 andmete kokkuviimine toimubki põhimõttel : mida rohkem häiritud DNA paljundamine, seda viletsam rakkude kasv. Seetõttu on seos jooniste 11 ja 12 vahel järgmine :

Joonis 11		Joonis 12
Mutant I	-	2
Mutant II	-	4
Mutant III	-	1
Mutant IV	-	3

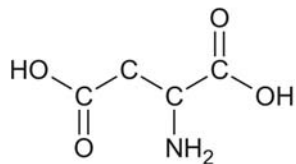
Järelikult : õige vastusevariant oli A

Küsimus 31. Lämmastikaluste asendused ja nende mõju

Lämmastikaluste asendused (mutatsioonid) mingit valku kodeerivas geenis viivad mõnikord (aga mitte alati) aminohapete asendumisele antud valgus. Mida sarnasemad oma keemilistelt omadustelt need kaks aminohapet on, seda väiksemat mõju valgu funktsioneerimisele see asendus omab. Aminohappe keemilised omadused määrab ära tema kõrvalahel – seega mida sarnasemad on kõrvalahelad, seda väiksem mõju on asendusel. Kõigist küsimuses toodud variantidest on kõrvalahelate poolest kõige sarnasemad glutamiinhape ja asparagiinhape (variant B).



Glutamiinhape - Glu



Asparagiinhape - Asp