

## Téma: Glykolýza a bunkové dýchanie

Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza je enzým, ktorý sa zúčastňuje na rozklade glukózy počas anaeróbnej glykolýzy. Tento proteín je konzervovaný medzi všetkými eukaryotmi, čo znamená, že jeho aminokyselinové zloženie sa v evolúcii menilo iba veľmi málo. Túto vysokú mieru konzervovanosti môžeme pozorovať pravdepodobne preto, že hrá dôležitú úlohu v metabolizme väčšiny organizmov. Okrem úlohy v rozklade glukózy má tento enzým aj viaceré neglykolytické funkcie. Ide napríklad o účasť pri apoptóze (programovanej bunkovej smrti), transporte látok z bunky, udržiavaní stability bunkovej DNA a podobne.

Rozhodli ste sa vo svojom výskume zamerať na neglykolytické funkcie glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH) u pívnej kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Vašou prvou úlohou je získať veľké množstvo tohto proteínu, ktorý potrebujete na rôzne experimenty. Najvhodnejším postupom je získať z kvasinky DNA génu *GAPDH* a túto DNA preniesť do baktérií. Baktérie sú schopné z tejto kvasinkovej DNA vyrobiť proteín GAPDH, ktorý vyzerá rovnako ako proteín vyrobený priamo v kvasinkovej bunke.

**1. úloha:** Úspešne sa vám podarilo preniesť gén *GAPDH* do baktérií. Baktérie začali proteín vyrábať a vám sa ho podarilo izolovať z bakteriálnej kultúry. Výsledkom vášho postupu je roztok proteínu GAPDH s neznámou koncentráciou.

Koncentráciu proteínu v roztoku dokážete určiť postupom, ktorý je známy ako Bradfordov test. Pri Bradfordovom teste sa využíva farbička Coomassie Brilliant Blue G-250. Kyslý roztok tejto farbičky je červený, pretože farbička je protonizovaná. Po pridaní proteínu do roztoku farbičky spolu proteín a farbička interagujú, viažu sa na seba a v dôsledku tejto väzby sa mení farba roztoku na modrú, pretože molekula farbičky je deprotonizovaná. Zmena farby roztoku sa dá merať ako zmena absorbancie svetla s vlnovou dĺžkou 595 nm. Čím viac farbičky je v deprotonizovanom stave, tým viac svetla s touto vlnovou dĺžkou vzorka absorbuje, a tým je teda vyššia absorbancia.

a) Ako sa pri Bradfordovom teste mení absorbancia vzorky pri 595 nm so zvyšujúcou sa koncentráciou proteínu vo vzorke?

---

Koncentrácia proteínu v danom roztoku sa nedá odhadnúť priamo z hodnoty absorbancie. Najprv je potrebné zistiť, aká koncentrácia proteínu zodpovedá jednotlivým hodnotám absorbancie. Na to sa používa tzv. **kalibračná krivka**. Keďže koncentráciu proteínu v našej vzorke nepoznáme a chceme ju zmerať, na zostrojenie kalibračnej krivky si musíme vybrať iný proteín. Pri Bradfordovom teste sa na to bežne používa hovädzí sérový albumín (BSA), proteín, ktorý sa vyskytuje v krvnej plazme hovädzieho dobytká. Proteín BSA môžeme použiť pri odhadovaní koncentrácie GAPDH, pretože roztoky týchto dvoch proteínov reagujú s farbičkou Coomassie veľmi podobne a približne rovnako sa u nich mení absorbancia pri 595 nm v závislosti od koncentrácie proteínu.

b) Na prípravu vzoriek s rôznou koncentráciou proteínu ste použili zásobný roztok BSA, ktorý mal koncentráciu **1 mg/ml**. V tabuľke nižšie je uvedené, koľko  $\mu\text{l}$  zo zásobného roztoku BSA ste pridali do každej vzorky. Vypočítajte, aká je výsledná koncentrácia BSA v jednotlivých vzorkách v  $\mu\text{g/ml}$ . (Výsledný objem každej vzorky bol 1 ml, objem bol doplnený vodou a roztokom farbičky Coomassie.)

**Tabuľka 1.**

Objem použitého zásobného roztoku BSA [ $\mu\text{l}$ ]	Výsledný objem vzorky [ $\mu\text{l}$ ]	Výsledná koncentrácia BSA [ $\mu\text{g/ml}$ ]
0	1000	
1	1000	
2	1000	
10	1000	
20	1000	

Na samotnú kalibráciu ste sa rozhodli použiť roztoky s koncentráciou BSA 1, 2, 4, 6 a 8  $\mu\text{g/ml}$ . Tabuľka uvedená nižšie udáva, aká absorbancia bola nameraná pre rôzne koncentrácie BSA vo vzorke.

**Tabuľka 2.**

Číslo vzorky	Koncentrácia BSA vo vzorke [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Absorbancia pri 595 nm
1	0	0
2	1	0,076
3	2	0,112
4	4	0,186
5	6	0,256
6	8	0,383

c) S použitím priloženého milimetrového papiera zostrojíte na základe nameraných hodnôt z tabuľky 2 kalibračnú krivku. Kalibračná krivka vyjadruje závislosť hodnoty absorbancie pri 595 nm od koncentrácie BSA vo vzorkách (na osi x bude teda koncentrácia BSA). Táto závislosť by mala byť lineárna. Krivku by ste mali zostrojiť tak, aby ste vzali do úvahy všetkých šesť bodov.

c) Predstavte si hypotetickú situáciu, že pri opakovaní experimentu by ste omylom zabudli prepnúť spektrofotometer na meranie pri 595 nm (žlté svetlo). Až po meraní ste si všimli, že prístroj bol nastavený na meranie pri 470 nm (modré svetlo). Nižšie je tabuľka absorbancií, ktoré ste namerali (Tabuľka 3). Ako by ste vedeli vysvetliť namerané údaje? Prečo sa absorbancia pri 470 nm znižuje so zvyšujúcou sa koncentráciou proteínu? (Pomôcka: Farbička Coomassie v protonizovanom stave absorbuje najviac svetla pri vlnovej dĺžke 470 nm.)

**Tabuľka 3.**

Číslo vzorky	Koncentrácia BSA [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Absorbancia pri 470 nm
1	1	0,36
2	2	0,28
3	4	0,17
4	6	0,09
5	8	0,05

---

---

---

---

**Po dokončení tejto úlohy odovzdajte zostrojenú kalibračnú krivku na ohodnotenie. Zároveň dostanete zadanie s kalibračnou krivkou, s ktorou budete pracovať v ďalších úlohách.**

d) V tabuľke 4 sú uvedené absorbancie, ktoré ste namerali pri vlnovej dĺžke 595 nm pre vzorky 1, 2 a 3, obsahujúce GAPDH, izolovaný z bakteriálnej kultúry. Na základe kalibračnej krivky, ktorú ste dostali k dispozícii, určite, aká je koncentrácia GAPDH v meraných vzorkách a hodnoty doplňte do tabuľky.

**Tabuľka 4.**

Č. vzorky	Absorbancia pri 595 nm	Koncentrácia GAPDH vo vzorke [ $\mu\text{g/ml}$ ]
1	0,176	
2	0,158	
3	0,164	

e) Aká je priemerná koncentrácia GAPDH v meraných vzorkách?

Miesto na výpočet:

---

f) Vzorky s proteínom GAPDH, ktoré ste použili na meranie absorbancie, ste pripravili nasledovným spôsobom. K 1  $\mu\text{l}$  zásobného roztoku GAPDH ste pridali 200  $\mu\text{l}$  roztoku farbičky Coomassie G-520 a 799  $\mu\text{l}$  vody. Aká je koncentrácia GAPDH v zásobnom roztoku? Ako koncentráciu GAPDH vo vzorke

pri meraní môžete uvažovať priemer, ktorý ste vypočítali v úlohe e).

Miesto na výpočet:

---

Vďaka Bradfordovmu testu sa vám podarilo určiť, že proteín GAPDH izolovaný z baktérií má koncentráciu, ktorú ste vyrátali v úlohe 1f. Ďalej by ste sa chceli venovať skúmaniu jeho neglykolytických funkcií.

**2. úloha:** V literatúre ste sa dočítali, že okrem iných funkcií by sa GAPDH mala zúčastňovať aj ovplyvňovania expresie niektorých génov. To znamená, že môže ovplyvniť, koľko proteínu sa z daného génu v bunke vyrobí. Tento proces môže fungovať napríklad tak, že GAPDH sa viaže priamo na začiatok niektorého konkrétneho génu a tým ovplyvní mieru jeho transkripcie, teda prepis do RNA. Skúmate, ako GAPDH ovplyvňuje expresiu génu pre histón H1. Pri svojich experimentoch ste zistili, že GAPDH sa neviaže priamo na DNA, ale aj tak ovplyvňuje prepis RNA z génu pre histón H1. Ako by sa to podľa vás dalo vysvetliť?

- A. GAPDH sa viaže na proteínový produkt tohto génu, histón H1
- B. GAPDH sa viaže priamo na ribozómy a tak zabraňuje transkripcii
- C. GAPDH zabraňuje presunu DNA do cytoplazmy
- D. GAPDH sa viaže na iné proteíny, ktoré sa viažu na DNA a tento komplex ovplyvní transkripciu génu pre histón H1
- E. GAPDH sa viaže na RNA, ktorá sa potom nemôže presunúť do endoplazmatického retikula, kde by došlo k transkripcii

Voľbu odpovede vysvetlite.

---

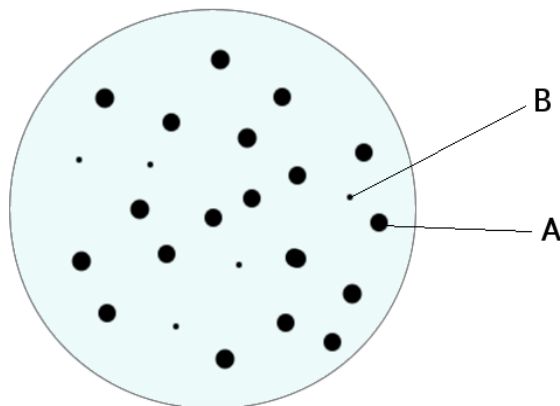
---

---

---

**3. úloha:** Enzým, ktorý skúmate, GAPDH, je zapojený v bunke do anaeróbnej glykolýzy. Pri tomto procese, ktorý sa odohráva v cytoplazme, je molekula glukózy rozložená na pyruvát a bunka pri tom získava 2 molekuly ATP. Pyruvát potom bunky dokážu ďalej zužitkovať v Krebsovom cykle a následne v dýchacom reťazci, kde je z jednej molekuly glukózy získaných ďalších 36 molekúl ATP.

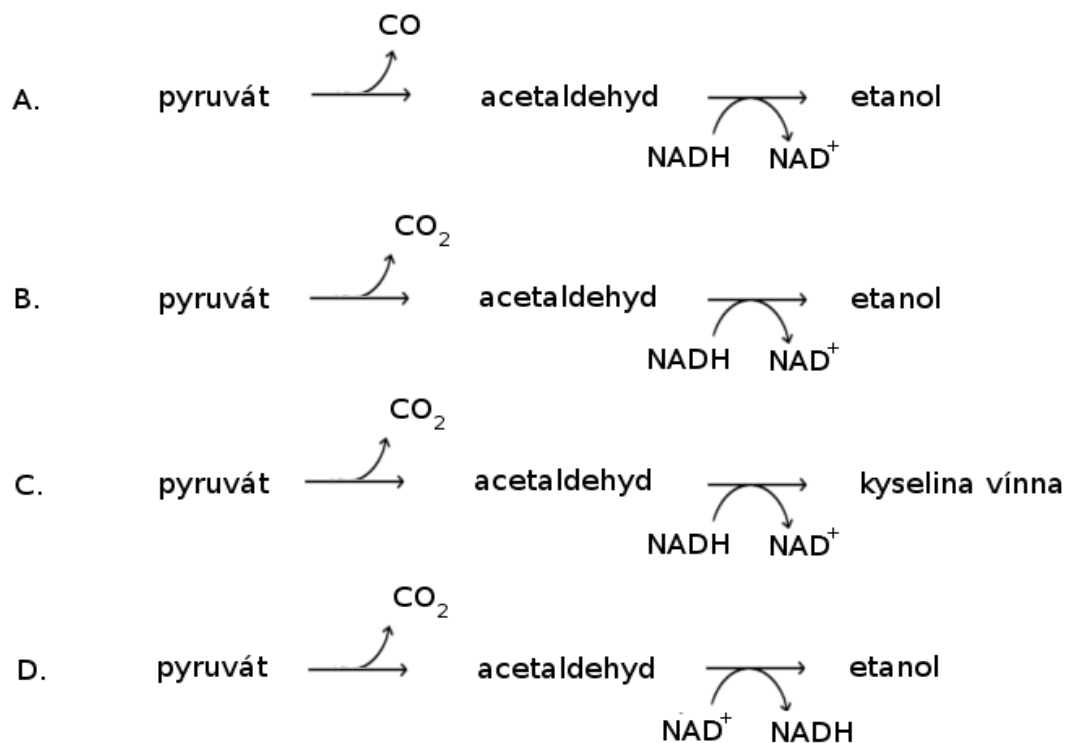
Pri vašich pokusoch v laboratóriu ste pracovali s kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasinky kultivujete na živnej pôde, ktorá ako zdroj energie obsahuje glukózu a glycerol. Glukózy je v médiu pomerne málo, ale glycerolu je dostatok. Glycerol je látka, ktorú bunky vedia využiť ako zdroj energie iba v prítomnosti kyslíka, pričom ATP je produkovaná najmä v procese oxidatívnej fosforylácie. Zistili ste, že pri kultivácii kvasinkových buniek na uvedenej živnej pôde v Petriho miske sa objavujú dva typy kolónií (obr. 1). Prvý typ sú veľké kolónie, ktorých je väčšina (A). Druhý typ sú kolónie, ktoré sú menšie a rastú pomalšie ako veľké kolónie (B). Keď ste bunky z jednotlivých kolónií bližšie preskúmali, zistili ste, že bunky, ktoré sa nachádzajú v kolóniách typu B, majú poškodený jeden typ organel. O ktorú organelu sa podľa vás jedná? Vysvetlite svoju odpoveď. Prečo sú kolónie buniek s poškodenou organelou menšie?



Obr. 1

**4. úloha:** Pri nedostatku kyslíka v prostredí dokážu niektoré organizmy využívať anaeróbnú glykolýzu ako jediný zdroj energie. Pri tomto procese je však nevyhnutná prítomnosť kofaktora  $\text{NAD}^+$  (nikotínamid dinukleotid).  $\text{NAD}^+$  sa v procese anaeróbnej glykolýzy redukuje na  $\text{NADH}$ . Po čase by tak bunky využívajúce anaeróbnú stratégiu získavania ATP boli limitované nedostatkom  $\text{NAD}^+$ . Aby táto situácia nenastala,  $\text{NADH}$  je oxidovaný späť na  $\text{NAD}^+$  v procese kvasenia. Alkoholové kvasenie ľudstvo už po stáročia využíva na získavanie alkoholu s využitím kvasiniek, či už ide o víno alebo pivo.

a) Označte, ktorá z uvedených chemických reakcií prebieha pri alkoholovom kvasení.



b) Pri spomínanej príprave vína isté druhy kvasiniek prestávajú byť s pokračujúcim procesom kvasenia životaschopné. Tieto kvasinky sú adaptované na istú koncentráciu konkrétnej látky v prostredí, a keď

koncentrácia tejto látky prekročí limit, tieto bunky tu ďalej nie sú schopné existovať. O akej látke sa hovorí?

A. kyselina mliečna

B. kyselina maslová

C. kyselina listová

D. metanol

E. etanol

F.  $\text{NAD}^+$

G.  $\text{NADH}$

H. kyselina vínna