

WPROWADZENIE

Pomysł na napisanie tego podręcznika rodził się w mojej głowie już przez długi czas, jako że takich pozycji na rynku nie ma w ogóle. Przygotowując się do Olimpiady miałem cały czas wrażenie, że nie uczę się z odpowiednich źródeł. Nie potrafiłem ocenić czy to, czego się uczę jest na wystarczającym poziomie skomplikowania, czy też odwrotnie - wchodzę w niepotrzebne szczegóły. Niestety - zakres zagadnień wymaganych na zawodach centralnych nie ma górnej granicy. Starłem się zatem, aby „Biochemia” była jak najlepiej dostosowana do zagadnień olimpijskich, a w niektórych miejscach wykraczała poza ten poziom (choć często w ramach ciekawostki). Największą przewagą tego podręcznika jest rozdział czwarty, w którym krok po kroku omawiam każde zagadnienie biochemiczne ujęte w regulaminie Olimpiady Biologicznej. Dokładny opis technik laboratoryjnych, a także praktyczne wskazówki wydają się nieocenione w przygotowaniu do finału konkursu.

Z początku miał być to więc rozszerzony informator biochemiczny; poszedłem jednak o krok dalej i zdecydowałem się omówić większość zagadnień, które uplasowałbym w dziale „metabolizm”. Dodatkowo, zamieściłem wyczerpujące opisy najważniejszych związków organicznych, które mogą przydać się przy zadaniach testowych na teście teoretycznym. Przed przeczytaniem pierwszych dwóch rozdziałów gorąco zachęcam do opanowania materiału szkolnego, gdyż są one nieco trudniejsze. Podrozdział o cukrach

(2.5.) zredagowała moja ukochana dziewczyna, Marta Kowalska. Jako studentka biochemii, miała znacznie więcej do powiedzenia na temat tej (znienawidzonej przeze mnie) grupy związków. Tam, gdzie nie musiałem - nie wchodziłem w zbędne szczegóły, aby nie oddawać w Twoje ręce drugiej Biochemii Stryera. Wybrałem najważniejsze szlaki metaboliczne i w przystępny sposób przedstawiłem zachodzące podczas nich reakcje. Moim celem było stworzenie kompendium wielofunkcyjnego. Po pierwsze, zawiera on kompletny materiał, który jest wymagany w ramach pracowni biochemicznej. Po drugie, pełni funkcję swego rodzaju vademecum, które umożliwia szybkie prześledzenie reakcji wybranych szlaków metabolicznych. Po trzecie, opisy szlaków są wzbogacone w rysunki, które pomagają zrozumieć dane zagadnienie. Po czwarte, objętość kompendium pozwala tuż przed finałem prześledzić większość zagadnień i odświeżyć Twoją wiedzę. Sam (-a) rozstrzygniesz, czy udało mi się te cele osiągnąć.

Pamiętaj, że Olimpiada to nie jest konkurs tak bardzo pamięciowy, jak matura - bardzo często oceniana jest *umiejętność wpadania na pomysł i zdolność logicznego myślenia*. Choć książka ta oczywiście nie zastąpi akademickiego podręcznika do logiki matematycznej, mam głębokie przeczucie, iż tak jak to jest w matematyce, tak i w biologii obycie z danym tematem znacznie ułatwia rozważanie problemów z nim związanych.

Trzymam kciuki,

Michał Stanowski

3.6.4. Fotosynteza C₄ i CAM

Istnieją rośliny, które w związku z gorącym klimatem, w którym występują, muszą znacznie efektywniej gromadzić dwutlenek węgla. Skutkuje to między innymi ograniczeniem procesu **fotoodychania**. Fotooddychanie polega na utlenianiu, a nie karboksylacji rybulozo-1,5-bisfosforanu. Wynika to z niskiej specyficzności substratowej karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBisCO). W sytuacji, gdy stężenie tlenu jest wysokie, a dwutlenku węgla niskie przeprowadza ona wysoce nieopłacalną dla komórki oksygenację rybulozo-1,5-bisfosforanu. Zamiast dwóch cząsteczek 3-fosfoglicerynianu powstaje **fosfoglikolan**, który jest cząsteczką dwuwęglową (bo $3 + 2 = 5$). Wyobraźmy sobie sytuację kiedy do 6 cząsteczek rybulozo-1,5-bisfosforanu przyłącza się 6 cząsteczek tlenu (gdyby był to dwutlenek węgla, powstałoby 12 cząsteczek 3-fosfoglicerynianu). Powstaje 6 cząsteczek 3-fosfoglicerynianu i 6 fosfoglukonianu. Następnie te 6 cząsteczek fosfoglukonianu ulega przemianom, podczas których dochodzi do trzech dekarboksylacji. Mamy zatem 6 atomów węgla do dyspozycji - komórka **tracąc energię ATP** tworzy 3 cząsteczki 3-fosfoglicerynianu. Mamy zatem 9 cząsteczek 3-fosfoglicerynianu. Straciliśmy w procesie dekarboksylacji **trzy atomy węgla**, zupełnie bezsensownie! A do tego zużyliśmy energię ATP! U roślin C₃, u których pierwszym związkiem po asymilacji węgla jest 3-fosfoglicerynian (większość roślin) - związek trójwęglowy⁴⁴, proces fotoodychania nie jest niczym niezwykłym. Przedstawię teraz dwie strategie roślin, które ograniczają ten proces praktycznie do zera.

Rośliny C₄ poradziły sobie, rozdzielając fazę ciemną na dwa procesy asymilacji. Pierwszy z nich następuje w „przeciętnych” komórkach mezofilu - występuje tam enzym **karboksylaza fosfoenolopirogronianu** - związku trójwęglowego, z którym spotkaliśmy się już chociażby podczas szlaku glikolizy. Zaraz, zaraz - to przecież jedna z ważniejszych reakcji anaplerotycznych - karboksylacja fosfoenolopirogronianu (R11.1.) powodowała powstanie szczawiooctanu (związek ten od razu jest transportowany do stromy chloroplastu)! Jest to związek czterowęglowy - i stąd nazwa roślin C₄. Jest to niestety proces, który wymaga dostarczenia energii ATP. Następnie musimy w jakiś sposób przetransportować związany dwutlenek węgla do komórek pochwy okołowiązkowej, gdzie znajdzie znany już Ci dobrze cykl Calvina-Bensona. Na początku jednak komórka wykona jeszcze jeden *genialny* ruch! Ze szczawiooctanu, cały czas w obrębie stromy chloroplastu komórka robi jabłczan (R11.2.), przeprowadzając redukcję tego pierwszego. Zredukowanym przenośnikiem elektronów biorącym udział w reakcji

⁴⁴ Stąd C₃ w nazwie.

jest NADPH + H⁺. A zatem jabłczan jest teraz transportowany plazmodesmami do komórki pochwy okołowiązkowej, gdzie dostaje się do stromy chloroplastu - tam ulega dekarboksylacji i utlenieniu na raz dzięki **chloroplastowej dehydrogenazie jabłczanowej, dekarboksylującej**. Uwolniony zostaje nie tylko dwutlenek węgla, ale powstaje NADPH + H⁺ (RVI.7.), składnik siły asymilacyjnej, który będzie mógł oddać swoje elektrony w etapie redukcji cyklu Calvina! Powstaje także pirogronian, który musi zostać przetransportowany do komórki mezofilu i tam, w obrębie stromy chloroplastu ulega fosforylacji do fosfoenolpirogronianu przy udziale **chloroplastowej dikinazy pirogronian-P_i** (odłącza się pirofosforan, a nie fosforan nieorganiczny, RVI.8.). Widzisz teraz, że u roślin C₄ RuBisCO nie ma wyboru - musi przeprowadzać karboksylację rybulozo-1,5-bisfosforanu, gdyż roślina dba o koncentrację tego związku w pobliżu tego enzymu, prowadząc dekarboksylację jabłczanu w obrębie stromy. W ten sposób rośliny te wydajniej wiążą dwutlenek węgla, w krótszym okresie otwarcia szparek, przez co nie tracą tak dużej ilości wody na drodze transpiracji. Do roślin C₄ należą popularne rośliny uprawne, takie jak ryż, kukurydza, trzcina cukrowa, proso i sorgo.

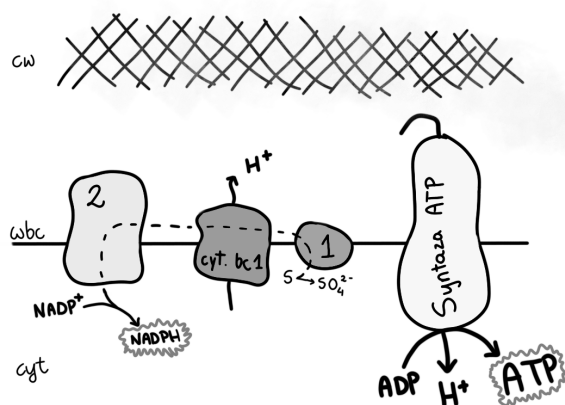
Rośliny CAM rozdzielają fazę ciemną w czasie, lecz obie asymilacje dwutlenku węgla zachodzą w obrębie tej samej komórki. Nocą, kiedy liście nie są nagrzewane przez słońce (transpiracja jest bardzo słaba), roślina otwiera aparaty szparkowe i asymiluje dwutlenek węgla przy pomocy karboksylazy fosfoenolpirogronianowej, dzięki czemu powstaje szczawiooctan. Szczawiooctan przekształcany jest do jabłczanu, a ten zostaje przetransportowany do wakuoli, gdzie jest magazynowany⁴⁵. W dzień, kiedy roślina przez dbałość o odpowiedni bilans wodny nie może sobie pozwolić na otwarcie szparek, jabłczan wydostaje się z wakuoli, ulega dekarboksylacji i roślina „bezsstresowo” może prowadzić fazę ciemną bez otwierania aparatów szparkowych. Proces przekształcenia fosfoenolpirogronianu w szczawiooctan znów wymaga energii ATP, ale owy ubytek rekompensowany jest przez dużą wydajność fotosyntezy.

3.7. Chemosynteza

Chemosynteza jest procesem niezwykle ciekawym, choć niestety niezwykle skąpo opisywanym w podręcznikach szkolnych. Także tutaj nie zawrę wielu szczegółów i podam tylko podstawowe informacje na jego temat. Sam proces, podobnie jak fotosynteza, ma w nazwie „syntezę”, a więc spodziewamy się, że w jakiś sposób komórka będzie musiała wytworzyć ATP i zredukowany przenośnik elektronów, tak jak

⁴⁵ Reakcje identyczne jak u roślin C₄.

działo się to w fazie jasnej fotosyntezy. Tam energia do tego procesu pochodziła ze światła słonecznego, tutaj o takim zjawisku nie ma mowy. Prokaryoty, bo tylko w tej grupie organizmów obserwujemy chemosyntezę, do syntezy związków organicznych będą używały energii utleniania nieorganicznych związków chemicznych (lub metanu). Nazwy bakterii przeprowadzających chemosyntezę od razu mówią nam, jaki związek będzie utleniany - bakterie żelazowe (węglany żelaza), wodorowe (wodór), siarkowe (siarkowodór, siarkę). Nie chodzi w żadnym wypadku o to, żeby nauczyć się na pamięć reakcji utleniania tych związków - ważny jest zamysł. Jak zatem otrzymać ATP i



Odwrócony transport elektronów

- cw - ściana komórkowa
- wbc - wewnętrzna błona cytoplazmatyczna
- cyt - cytozol
- 1 - enzym utleniający siarkę
- 2 - kompleks redukujący NADP⁺

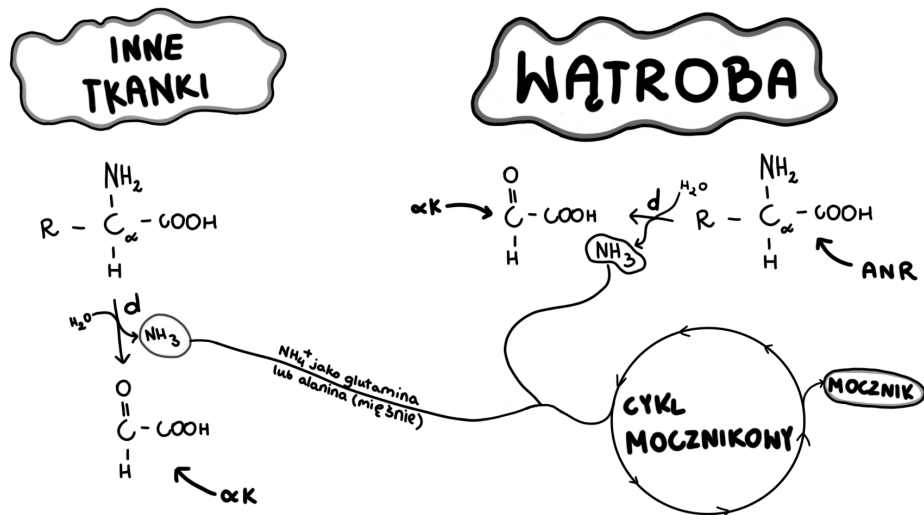
zredukowany przenośnik elektronów - tu NADH - z samego utleniania związków nieorganicznych? Okazuje się, że te organizmy wykorzystują **odwrócony transport elektronów**. Na czym on polega? Elektrony z np. siarki pierwiastkowej dostają się na cytochrom *bc1* w wewnętrznej błonie bakterii Gram-ujemnej. „Prawidłowo”, to znaczy zgodnie z potencjałem oksydoredukcyjnym (patrz 3.6.1.1.), elektrony powinny dążyć do zredukowania tlenu, tak jak dzieje się to w procesie oddychania tlenowego. Komórka robi jednak „psikus” i elektrony zaczynają przemieszczać się wbrew potencjałowi oksydoredukcyjnemu! A to znaczy, że w pewnym momencie docierają na kompleks, który w oddychaniu tlenowym powodował utlenienie NADH + H⁺. W tym przypadku elektrony są przekazywane na NADP⁺ i powstaje NADPH + H⁺, a więc zredukowany przenośnik! Czy to nie genialne? Co więcej, elektrony przechodząc przez przenośniki w błonie, powodowały pompowanie protonów z cytosolu do przestrzeni międzybłonowej, generując gradient protonów dla syntazy ATP. A zatem mamy pełną siłę asymilacyjną. Niestety, proces nie jest tak efektywny jak fotosynteza. Zauważ, że odwrócony transport elektronów musi być wymuszony, a do tego jest potrzebna energia zgromadzona w ATP. A zatem jest to zjawisko nieco mniej efektywne od fotosyntezy, ale także skuteczne. Następnie chemolitoautotrofy wiążą dwutlenek węgla w cyklu Calvina,

który opisany jest w podrozdziale 3.6.2. Chemosynteza jest procesem ewolucyjnie znacznie starszym niż fotosynteza.

3.8. Degradacja aminokwasów i nukleotydów

Nie sposób opisać na poziomie olimpijskim wystarczająco szczegółowo procesów rozkładania aminokwasów i nukleotydów. Podam w tym podrozdziale najważniejsze fakty, które mogą być użyteczne w rozdziale następnym albo w pytaniu jednokrotnego wyboru na Olimpiadzie.

Nadmiarowe szkielety aminokwasowe w organizmie nie są magazynowe, a zużywane jako źródło energii, bądź przekształcane w inne związki (np. glukozę na drodze glukoneogenezy), które już mogą być materiałem zapasowym. Azot wchodzący w skład grupy α -aminowej aminokwasów może być zużywany do syntezy innych związków; jeśli tak nie jest, to jon amonowy musi zostać wydany w postaci mocznika, co zostało opisane w podrozdziale 3.9. Na przykład, wątroba spala tylko aminokwasy nierozgałęzione, a mięśnie także rozgałęzione. Mięśnie muszą w jakiś bezpieczny sposób dostarczyć do wątroby jon amonowy, aby tam został włączony w cykl



Uproszczony schemat degradacji aminokwasów
d - deaminacja, ANR - aminokwasy nierozgałęzione,
 αK - α -ketokwasy później spalane przez komórke

Dobrze, mamy już tabelę wartości dla naszej pierwszej funkcji, którą umieścimy na wykresie Lineweavera-Burka. Funkcja ta ma postać $f_1(x) = ax + b$. Oczywiście możemy „na oko” wartości a i b wyznaczyć przenosząc punkty na wykres (zazwyczaj działa) i prowadząc przez nie prostą, ale bezpieczniej jest wyznaczyć linię regresji w prostym języku programowania lub w arkuszu kalkulacyjnym. Program zwróci nam współczynniki a i b , to znaczy dostaniemy pełny wzór funkcji, który będziemy mogli użyć do dalszych obliczeń. Jako, że jestem bioinformatykiem, zdecydowanie bliższy jest mi sposób pierwszy, dlatego proszę spojrz na te trzy linijki kodu w języku R:

```
x <- c(2, 0.35, 0.19, 0.13, 0.1) # odwrotności stężeń początkowych
y <- c(0.041, 0.015, 0.013, 0.012, 0.012) # i szybkości początkowych
print(lm(y ~ x)) # oblicz współczynniki a i b funkcji i je wyświetl
```

Kiedy w RStudio klikniemy „Run” pojawią się następujące linijki kodu:

Call:

```
lm(formula = y ~ x)
```

Coefficients:

```
(Intercept)          x
  0.009848      0.015076
```

Intercept to wartość funkcji w punkcie przecięcia z osią OY, a „x” to współczynnik kierunkowy. W kilka sekund obliczyliśmy wzór $f_1(x) = 0.015x + 0.010$. Możemy z tego wzoru wywnioskować, że $V_{\max}$ wynosi $100.00 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$ (bo to odwrotność wyrazu wolnego), a K_{mp}^{66} :

$$0 = 0.015x + 0.010$$

$$x \approx -0.667$$

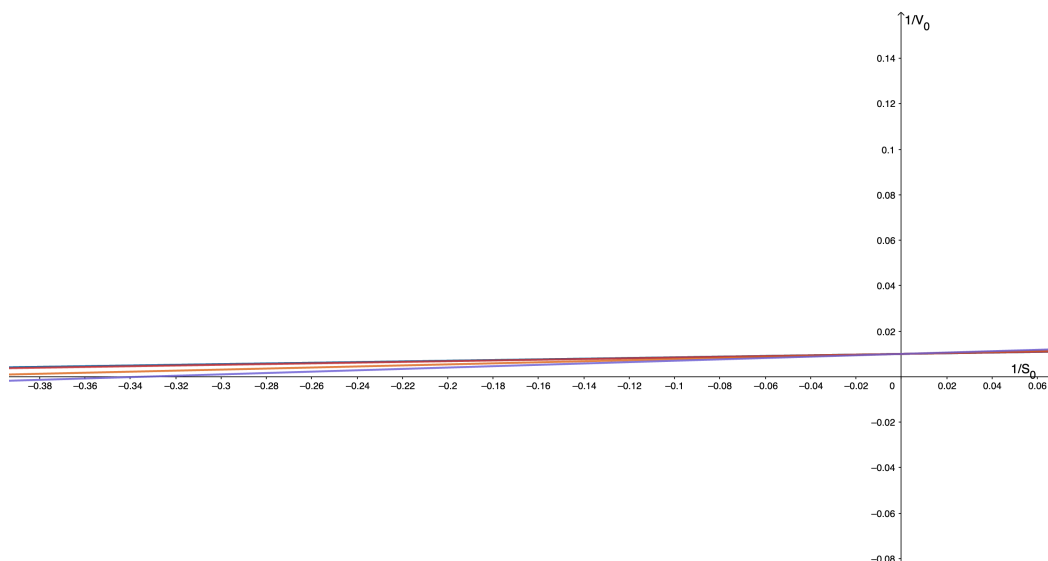
$$K_{\text{mp}} = -\frac{1}{x} \approx 1.5 \text{ mM}$$

Takie same kroki wykonujemy dla czterech pozostałych stężeń inhibitora⁶⁷ i porównujemy ze sobą otrzymane stałe Michaelisa-Menten i szybkości maksymalne. Ja wyliczyłem

⁶⁶ „mp” w indeksie dolnym stałej oznacza, że liczymy tak naprawdę **pozorną** stałą Michaelisa-Menten, ponieważ reakcja zaszła w obecności inhibitora.

⁶⁷ Dane, tak jak wcześniej, pochodzą z arkusza biochemicznego 50. Olimpiady Biologicznej.

już te funkcje sposobem przedstawionym wyżej i naniósł je wszystkie na jeden układ współrzędnych:



Te same wnioski, które wyniknęły z obliczeń wyżej, można wyciągnąć z wykreślenia 5 funkcji w programie GeoGebra (bądź rysując je na kartce). Widać, że wykresy przecinają oś OY w tym samym punkcie, a OX w różnych.

dla stężenia inhibitora = 0 mM

$$f_2(x) = 0.015x + 0.010$$

dla stężenia inhibitora = 0.1 mM

$$f_3(x) = 0.016x + 0.010$$

dla stężenia inhibitora = 0.5 mM

$$f_4(x) = 0.023x + 0.010$$

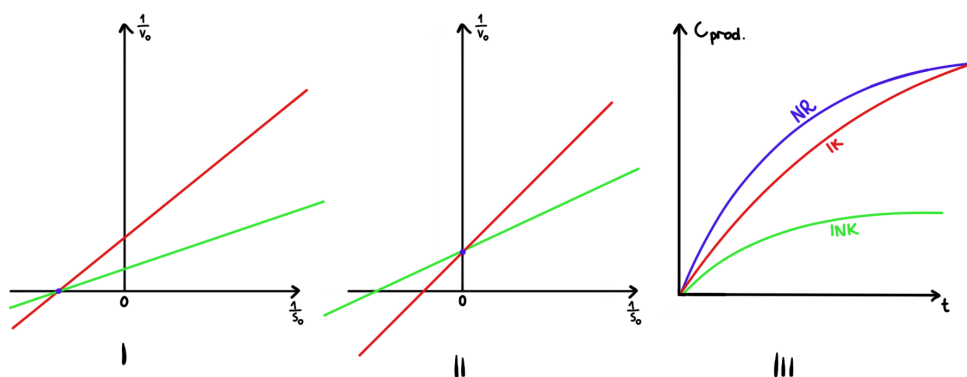
dla stężenia inhibitora = 1 mM

$$f_5(x) = 0.030x + 0.010$$

Chyba coś udało się nam osiągnąć! Wyraz wolny (a więc odwrotność prędkości maksymalnej) każdej funkcji jest równy tyle samo - pomyśl, co to może znaczyć.

Ta sama prędkość maksymalna reakcji przy różnych stężeniach inhibitora znaczy, że mamy do czynienia z **inhibicją kompetycyjną**. Przy inhibicji kompetycyjnej inhibitor, blokując centrum aktywne enzymu, zmniejsza jego powinowactwo do substratu, zwiększając tym samym stałą Michaelisa-Menten. Zapewne trudniej zrozumieć czemu nie zmienia się $V_{\max}$. Aby się o tym przekonać, należy traktować prędkość maksymalną jako zdolność centrum aktywnego do przekształcania substratu w produkt. Zauważ, że wiązanie się inhibitora kompetycyjnego z centrum aktywnym nie zmienia tej zdolności, a jedynie zmniejsza prawdopodobieństwa do związania substratu przez enzym. Jednakże to prawdopodobieństwo można bardzo łatwo zwiększyć, po prostu dodając do roztworu większą ilość substratu. Spodziewasz się pewnie teraz, że przy inhibicji **niekompetycyjnej** $V_{\max}$ będzie różna dla różnych stężeń inhibitora. Jeśli chodzi o różną

wartość $V_{\max}$ - myślę, że fakt ten wynika z przedstawionego przeze mnie toku myślenia. Jeśli prędkość maksymalną wiążemy ze zdolnością centrum aktywnego do przeprowadzania substratu w produkt, to oczywiście związanie się inhibitora niekompetycyjnego w miejscu allosterycznym enzymu tę zdolność obniży. Substratu można dodawać w niekończoność - nigdy nie spowoduje to jednak, że osiągniemy wyższą prędkość maksymalną, bo centrum aktywne ma zmienioną konformację. Jeśli zaś chodzi o różną stałą Michealisa dla inhibicji kompetycyjnej - choć prędkość maksymalna dla różnych stężeń inhibitora jest taka sama, to stężenie substratu, przy którym jest osiągana połowa tej prędkości⁶⁸ jest tym większe, im większe stężenie dodanego inhibitora. Idąc tym tokiem myślenia, ta sama stała Michealisa dla inhibicji niekompetycyjnej przy różnych prędkościach maksymalnych wynika z tego, że choć prędkość maksymalna jest różna ze względu na blokowanie zdolności enzymatycznych centrum aktywnego, to stała Michaelisa jest stała, bo enzym wiąże w każdym przypadku tyle samo substratu. Po prostu przy większym stężeniu inhibitora coraz mniej tego substratu będzie przekształcane w produkt, a to wiąże się już z różnymi prędkościami maksymalnymi.



Wykresy

Lineweaver-Burka

I - dla inhibicji niekompetycyjnej

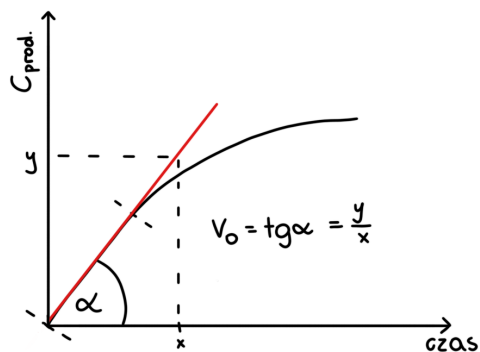
II - dla inhibicji kompetycyjnej

oraz krzywa progresji dla reakcji

NR - normalnej, IK - z inhibitorem kompetycyjnym, INK - niekompetycyjnym

Sprawa, która według mnie pozostaje niewyjaśniona dotyczy tego, czym tak naprawdę jest szybkość początkowa (V_0), której odwrotność oznaczana jest na osi rzędnych wykresu Lineweaver-Burka. Spójrz na ten wykres:

⁶⁸ Przypomnę, że taka jest definicja stałej Michealisa-Menten.



Wzrost stężenia produktu reakcji enzymatycznej w zależności od czasu

Jak widzisz, szybkość początkowa definiowana jest jako tangens kąta nachylenia prostej stycznej do początkowego, prostoliniowego fragmentu **krzywej progresji reakcji enzymatycznej** - wykresu przedstawiającego zmianę stężenia produktu tej reakcji w czasie.

Rozdział 4.2.1. dotyczył jednak spektrofotometrii, dlatego myślę, że warto do niej wrócić. Uczestnicy 48. Olimpiady Biologicznej dostali dane, na podstawie których musieli przewidzieć rodzaj inhibicji enzymatycznej. Jedna tabela przedstawiała zmianę absorbancji w czasie dla różnych stężeń początkowych bez obecności inhibitora:

	Czas reakcji [min]						
S_0 [mM]	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3
0.5	0.878	0.851	0.823	0.796	0.769	0.742	0.714
5	0.900	0.794	0.689	0.583	0.478	0.372	0.267
10	0.890	0.755	0.620	0.484	0.349	0.214	0.079

Na jej podstawie, uczestnik musiał podać zmianę absorbancji na minutę oraz szybkość początkową dla każdej próby. Choć ta pierwsza informacja jest bardzo łatwa do odczytania, bo wystarczy odjąć wartość absorbancji po 3 minutach od tej w momencie „zerowym” i podzielić przez trzy, tak wyliczenie szybkości początkowej do łatwych nie należy. Zauważmy, że nie mamy krzywej progresji reakcji, ale mamy inną, prostoliniową (!) zależność - zmianę absorbancji w czasie. Przy pomocy prawa Lamberta-Beera możemy bardzo prosto obliczyć V_0 , którą wyrażamy