



Masarykova univerzita

Přírodovědecká fakulta



ViBuCh

Vzdělávací ikurz pro budoucí chemiky

Vzdělávací ikurz pro budoucí chemiky

Řešení úkolů 4. série

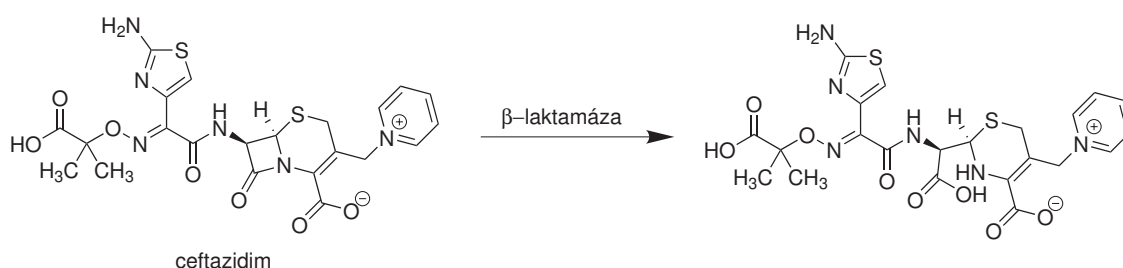
5. ročník (2014/2015)

A3 – Proteinové inženýrství a biokatalýza

Autor: Tomáš Buryška (e-mail: buryška.tomas@gmail.com)

12 bodů

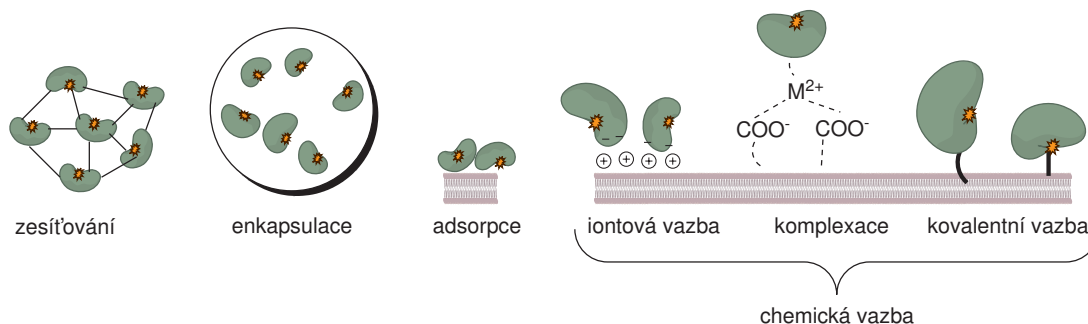
1. V prvním úkolu mě zajímaly proteiny, kde jednobodová mutace vedla ke zvýšení katalytické aktivity alespoň padesátkrát. Pro řešení jsem si vybral příklad β -laktamáz. Kde hned několik jednobodových mutací vedlo ke zvýšení aktivity enzymu, což vedlo ke snížení citlivosti organismu na konkrétní antibiotika, případně přímo vzniku rezistence. Abych byl konkrétní, tak mutace D240K tj. aspartátu za lyzin v pozici 240 měla za následek 75-násobné zvýšení katalytické účinnosti s ceftazidimem (analog ampicilinu). (3,0 b.)



2. Řešení v úloze dva je víc o matematice, ale chtěl jsem, aby jste si uvědomili, tu „nekonečnou“ možnost kombinací pro krátký protein. A to se prosím pěkně bavíme jen o základních aminokyselinách, navíc bez posttranslačních modifikací. Někteří z vás uvažovali nestandardních 22 (21) aminokyselin v základním kódu místo standardních 20, nebral jsem to jako chybu (když jsem to sám neupřesnil), pakliže byl postup v pořádku.

Pro tvorbu kompletní knihovny všech možných sekvencí máme tedy 19^{200} možností (také to můžeme vyjádřit jako $5,63 \times 10^{255}$). Nechutně velké číslo, které si nikdo neumíme dobře představit. Pro dvě náhrady kdekoli na řetězci jsme na tom o poznání lépe s 7,1839 miliony mutantů. Za jeden den analyzujeme 8,64 milionu variant. Pro zjednodušení uvažuji rok o 365 dnech, ono to stejně nemá na výsledek zásadní vliv. Doba analýzy tedy bude rovna $1,78 \times 10^{246}$ let a pro jednoduchou knihovnu 19 hodin 57 minut a 19 sekund. Jen dodám, že analýza 100 mutantů za sekundu je značně komplikovaná. (4,0 b.)

3. U imobilizace proteinů se obvykle bavíme o navázání proteinu na nosič (adsorpcí nebo chemickou vazbou), zesíťování, adsorpci nebo a enkapsulaci. Materiály používané při imobilizaci by měly být co nejvíce inertní, aby tak minimalizovaly vliv na funkce proteinu. Každá z metod má své klady a zápory a některé lze i kombinovat. Například lze enkapsulovat zesíťované enzymové agregáty.



V obrázku jsem se snažil trochu i zachytit skutečnost, že ne vždy jsou proteiny vhodně orientovány, což je největší nedostatek imobilizace jako takové. Špatná orientace se projevuje nižší aktivitou, často i velmi výrazně. Faktory ovlivňující funkčnost imobilizovaných proteinů jsou následující:

- hydrofóbní prostředí → vede k větší reaktivitě u hydrofobních substrátů
- mikroprostředí nosiče → stabilizace enzymu
- vícebodová imobilizace → vyšší teplotní stabilita / nižší aktivita
- oddělovač – raménko → brání špatné orientaci při imobilizaci
- difúzní omezení → nižší aktivita, vyšší stabilita
- špatný vazebný mód → vliv na aktivitu a stabilitu
- fyzikální struktura a vlastnosti nosiče → například velikost pórů rozhoduje o výměně solventů.

Z běžně používaných materiálů při imobilizaci a zesíťování jich zmíním jen pár: kolagen, celulóza, škrob, chitosan a chitin, alginát, pektin, sklo a celá škála syntetických polymerů (5,0 b.).

Snad jste se v celé sérii úloh o proteinovém inženýrství dozvěděli nové zajímavé informace. Těm z vás, kteří přijedou na soustředění v létě, můžu slíbit zajímavé experimenty z oblasti mikrofluidiky.

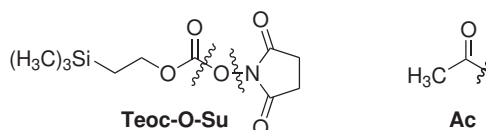
C3 – Organická syntéza

Autor: Roman Kučera (e-mail: 408476@mail.muni.cz)

14 bodů

 1. Řešení ($\frac{14}{33}$ b.):

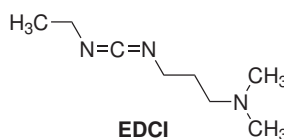
Zkratka	Vzorec	Chrání skupinu	Podmínky zavedení	Podmínky odstranění	Stabilní v
Bn	PhCH ₂ -	alkoholy, aminy	PhCH ₂ Cl, báze báze	H ₂ /PtO ₂	kyseliny, báze
MOM	CH ₃ OCH ₂ -	alkoholy	CH ₃ OCH ₂ Cl, báze	Kyselá hydrolýza	báze a slabé kyseliny
Ac	CH ₃ CO- aminy	alkoholy,	Ac ₂ O/AcCl + báze	Bazická hydrolýza	kyseliny a slabé báze
Teoc	viz níže	aminy	TeocOsu	Fluoridové ionty (Bu ₄ NF)	Slabé kyseliny a báze

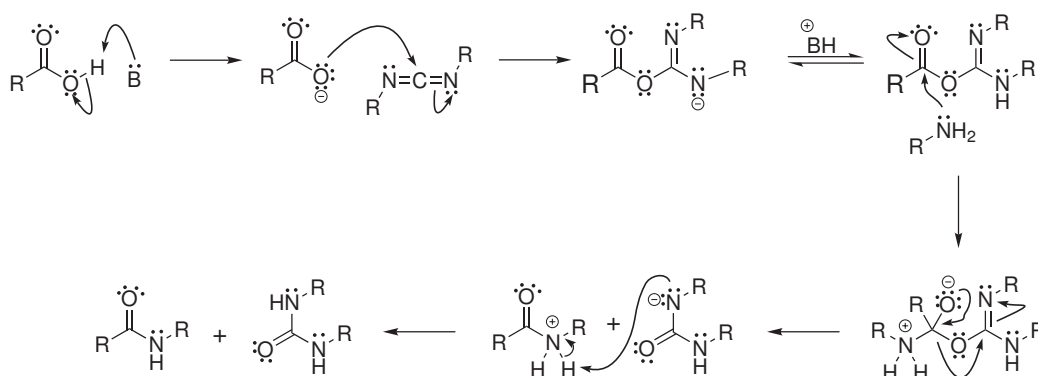

 2. Ideální chránící skupina ($\frac{14}{33}$ b.):

- měla by se lehce zavádět (velký výtěžek reakce),
- tolerovat co nejširší rozsah podmínek,
- ale zároveň by měla být selektivně odstranitelná (vysoký výtěžek reakce),
- s činidlem by se mělo dobře pracovat – netoxické, neprchavé, stabilní vůči hydrolýze. . .
- činidlo, kterým se zavádí, by nemělo být drahé.

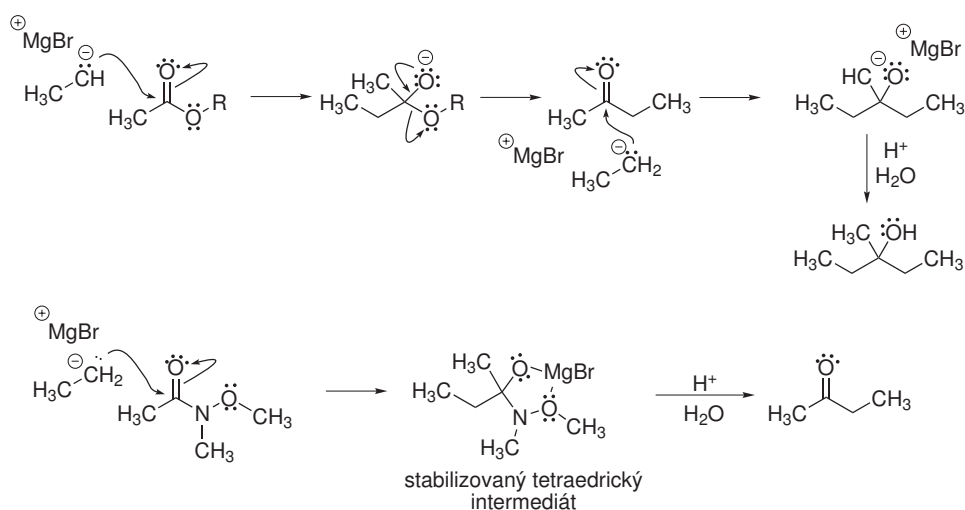
3. Jako už víme z úkolu 5 v úloze C2 (třetí série), smíchání karboxylové kyseliny a aminu nevede ke kvantitativní přeměně těchto látek na žádaný amid (viz řešení třetí série). Karboxylovou kyselinu je třeba nějakým způsobem aktivovat, například vytvořením chloridu karboxylové kyseliny, který následně reaguje s aminem za vzniku požadovaného amidu.

V tomto případě slouží k aktivaci karboxylové kyseliny sloučenina skrývající se pod zkratkou EDCI (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide). Mechanismus, jakým probíhá aktivace karboxylové kyseliny, je znázorněn ve schématu níže ($\frac{14}{33}$ b.).

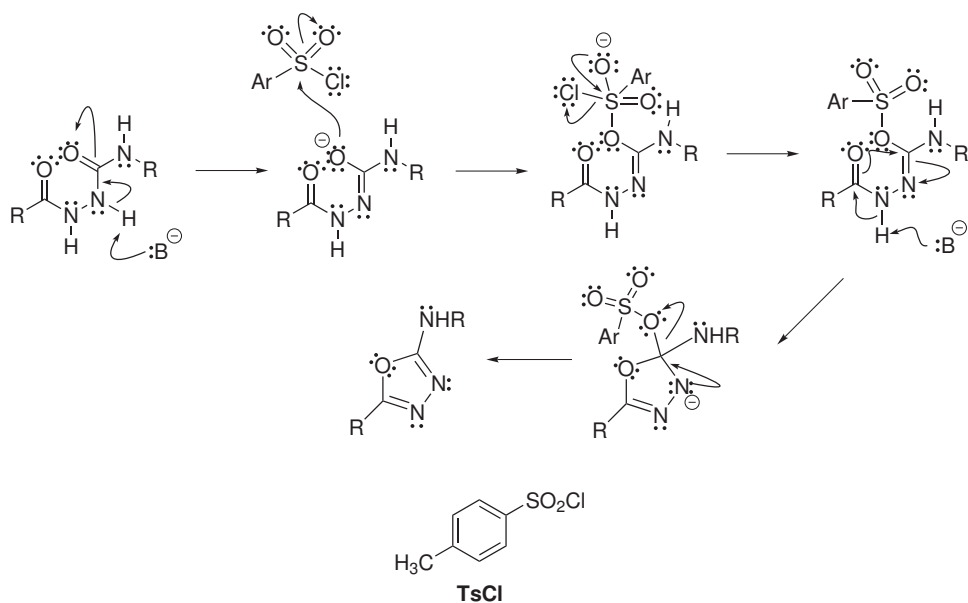




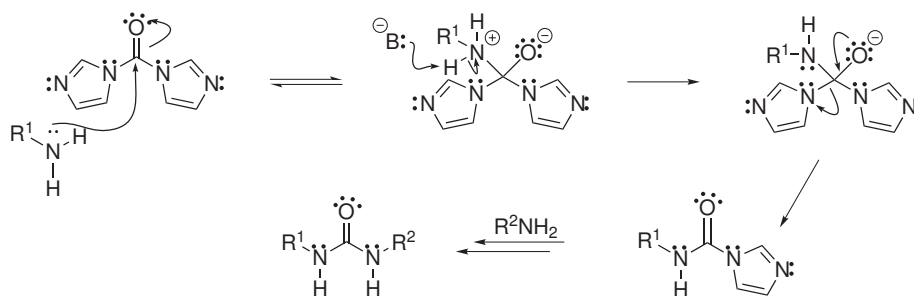
4. Pokud bychom se pokoušeli adovat Grignardovo činidlo např. na ester, mohlo by dojít k dvojnásobné adici za vzniku terciárního alkoholu. Weinrebův amid však po adici prvního ekvivalentu Grignardova činidla nepodléhá opětovné adici. Vznikající tetraedrický intermediát je stabilizován tvorbou chelátu s iontem kovu, a proto se nerozkládá na příslušný keton, který by podléhal další adici. K rozkladu tohoto stabilizovaného tetraedrického intermediátu dochází až při zpracování kyselinou, což má za následek i rozklad případných zbytků organokovového reagentu ($\frac{14}{33}$ b.).



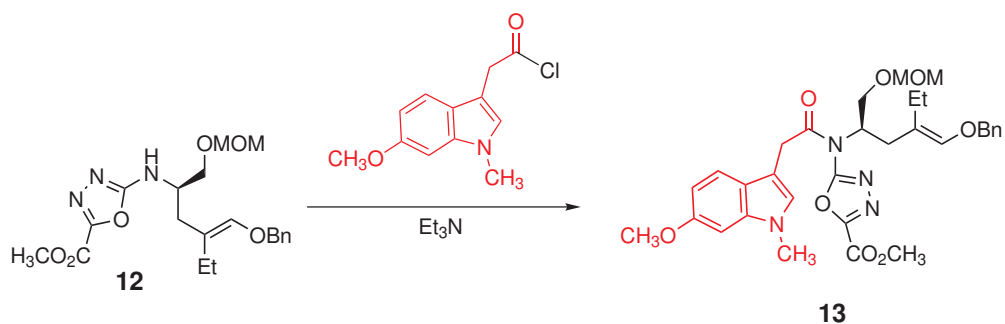
5. Hnací silou dané reakci je síla vazby křemík-fluor. Křemík a uhlík se nacházejí ve stejné skupině. Avšak křemík již má k dispozici volné *d*-orbitály a tak se může fluoridový iont vázat na křemík (fluorid poskytne jeden ze svých volných elektronových párů a zaplní tím vakantní *d*-orbital) za vzniku pětivazného intermediátu. Tento intermediát se následně rozpadne za odstoupení alkoholátu. Popsaný mechanismus je známý jako asociačně-disociační ($\frac{14}{33}$ b.).
6. Možný mechanismus je znázorněn ve schématu níže. Reakce je zahájena tosylací výchozí látky. Následně proběhne intramolekulární cyklizace a reakce je ukončena odstoupením tosylátu (velmi dobře odstupující skupina) ($\frac{14}{33}$ b.).



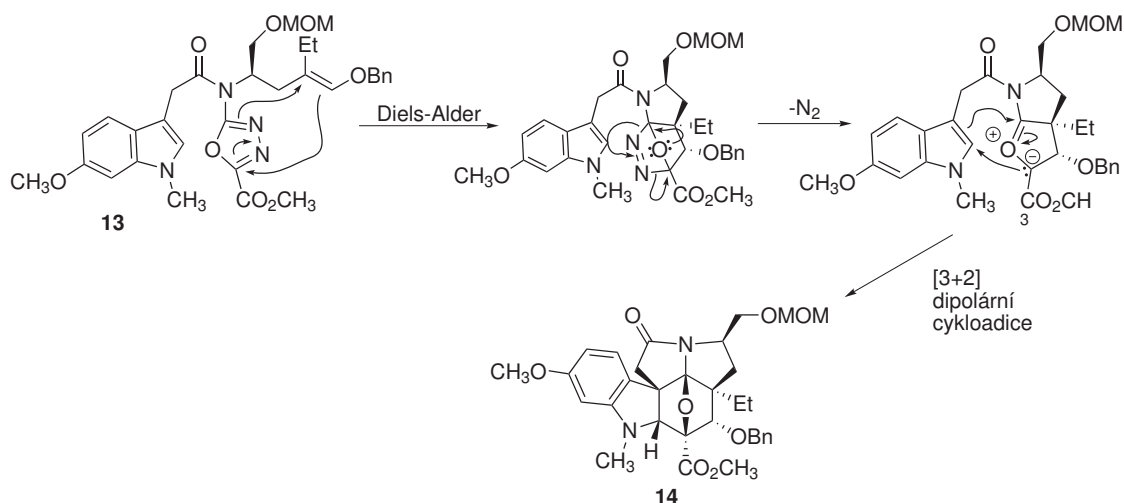
7. CDI = Carbonyldiimidazol. Tato sloučenina se užívá k přípravě karbonátů, substitovaných močovin a karbamátů z alkoholů a aminů, ale i k aktivaci karboxylových kyselin ($\frac{14}{33}$ b.).



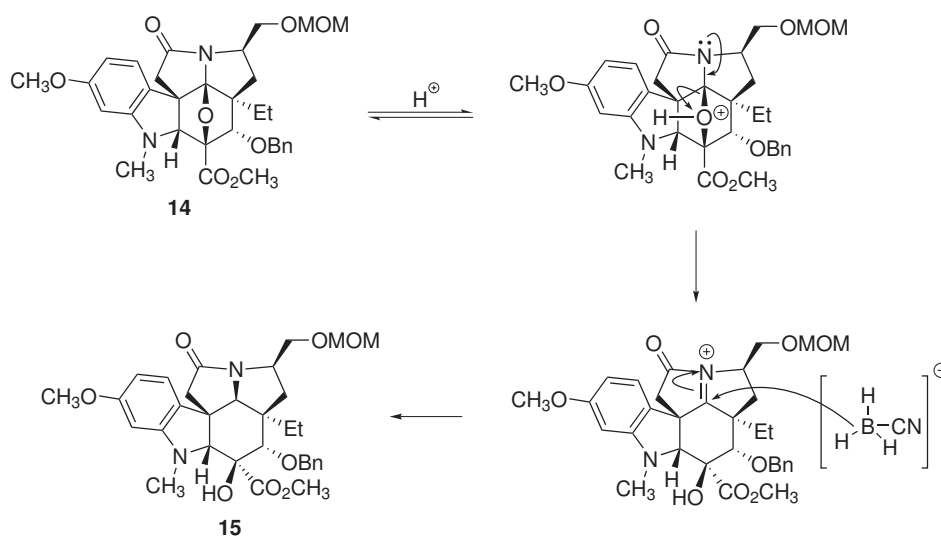
8. Jak již bylo zmíněno výše, k vytvoření amidu z aminu a kyseliny ve vysokém výtěžku je potřeba nějakým způsobem aktivovat kyselinu, např. ve formě jejího chloridu. Při použití halogenidu karboxylové kyseliny je nutno použít i vhodnou bázi, která bude lapat vznikající chlorovodík a bránit tak nežádoucím reakcím ($\frac{14}{33}$ b.).



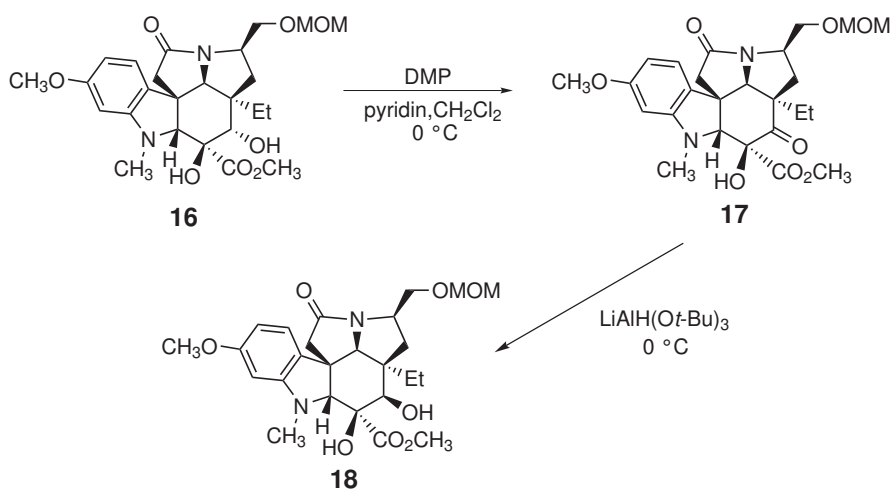
9. Jak bylo uvedeno v doprovodném textu, kaskáda začíná Dielskovou-Alderovou reakcí, pokračuje fragmentací za uvolnění molekuly dusíku a je zakončena [3+2] dipolární cykloadicí ($\frac{28}{33}$ b.).



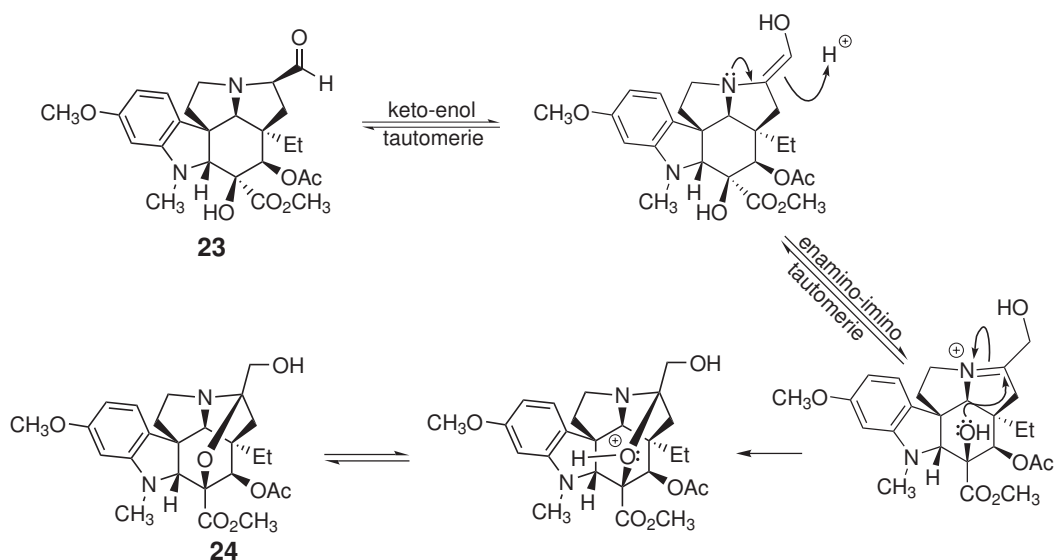
10. Možný mechanismus reakce je znázorněn ve schématu níže. Prvním krokem je protonace atomu kyslíku a parciální hydrolyza za vzniku acyliminiového iontu. Tato sloučenina následně podléhá formální adici hydridového iontu (z $NaBH_3CN$), který přistupuje z méně bráněné (konvexní) strany, což má za následek redukcí dvojně vazby iminiového iontu a vznik sloučeniny **15** ($\frac{14}{33}$ b.).



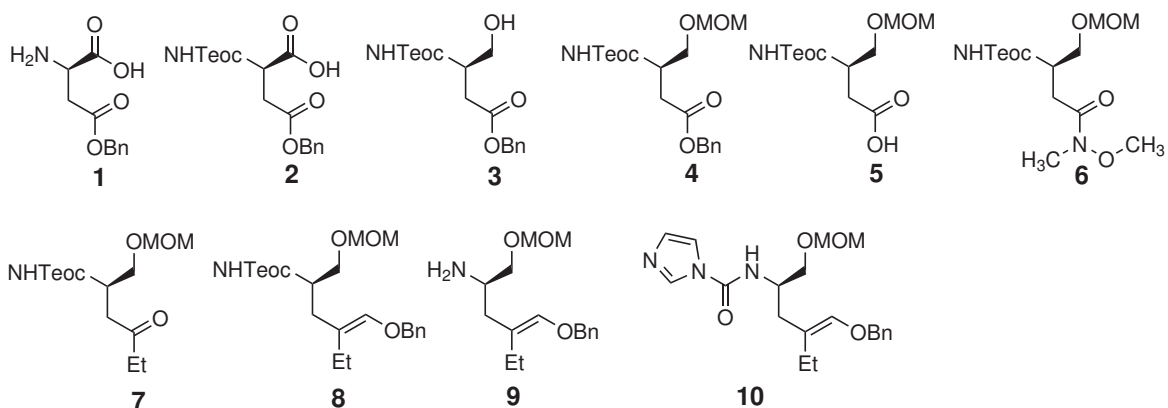
11. Při oxidaci alkoholu **16** na keton **17** se mění hybridizace atomu uhlíku z sp^3 na sp^2 a tím zaniká stereogenní centrum. Při následné redukcí vzniká sp^3 hybridizovaný atom uhlíku, který je opět stereogenním centrem. Hydrid při této redukcí přistupuje ze stericky méně bráněné strany. Selektivita dané reakce je umocněna použitím objemného redukčního činidla, které obsahu tři *tert*-butylové skupiny ($\frac{14}{33}$ b.).

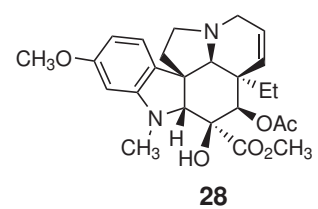
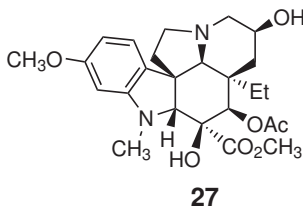
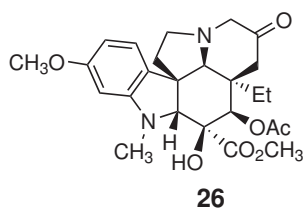
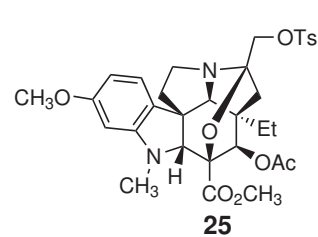
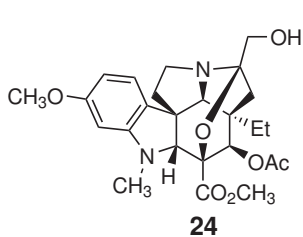
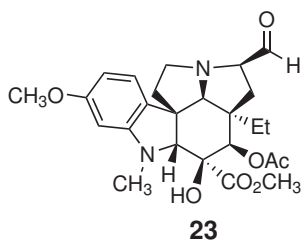
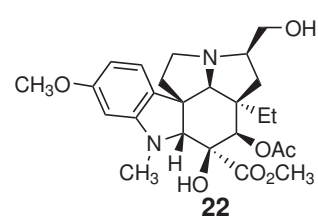
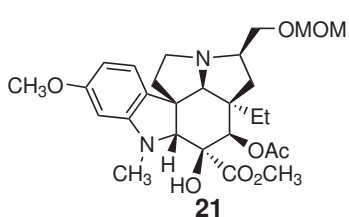
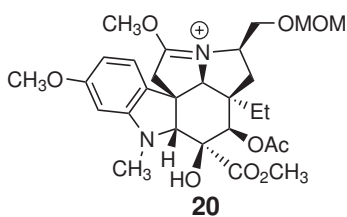
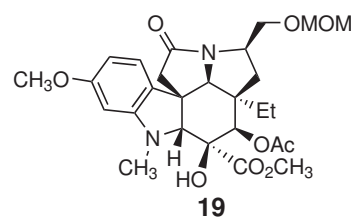
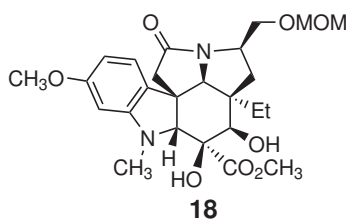
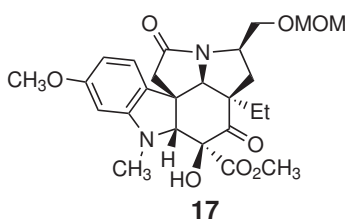
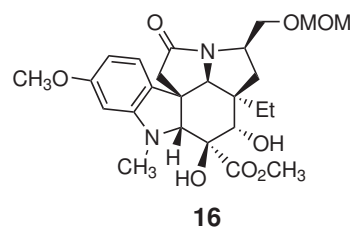
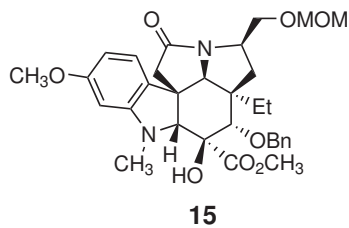
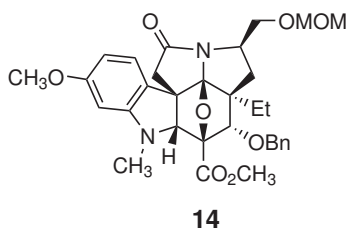
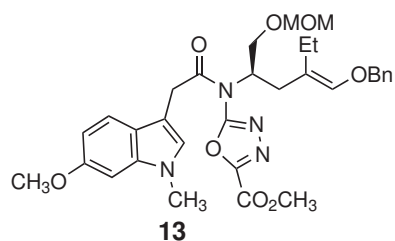
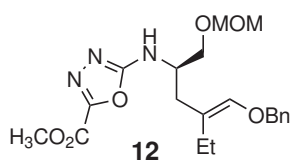
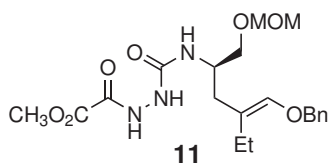


12. K uvedenému produktu je možné dospět pomocí zmíněných dvou tautomerních rovnováh. První je keto-enol tautomerie a druhá je enamino-imino tautomerie. Transformace je zakončena nukleofilní adicí alkoholu na násobnou vazbu iminiového iontu ($\frac{14}{33}$ b.).



13. Řešení ($\frac{280}{33}$ b.):





D3 – NMR spektroskopie biomolekul

Autor: Radovan Fiala (e-mail: fiala@chemi.muni.cz)

14 bodů

1. Řešení úkolu:

A – DNA

B – RNA

Ve spektru A jsou signály v oblasti 1,7 až 3 ppm, charakteristické pro vodíky 2' a 2'' v deoxyribose. RNA má na uhlíku 2' jen jeden vodík a -OH skupinu, a tak vodík 2' rezonuje při vyšších ppm 4,4 až 5,0 ppm. Dalším poznávacím znakem je ve většině případů existence ostrých signálů od methylové skupiny thyminu kolem 1 ppm. V našem případě se však jedná o spektrum DNA smyčky o sekvenci GCGAAGC, která thymin neobsahuje. **(2,0 b.)**

2. Řešení úkolu:

A:

CGCGAATTCGCG
GCGCTTAAGCGC

B:

TCTTGTGTTCT
AGAACACAAGA

Vzhledem k symetrii Dickerson-Drew dodekameru očekáváme 2 signály odpovídající AT párům a až 4 piky odpovídající GC párům, z nichž však 1 až dva mohou chybět v důsledku výměnné reakce s vodou. Tomu odpovídá spektrum A.

V druhé sekvenci máme 7 AT párů a 4 GC páry. Opět s uvážením, že signály od koncových párů mohou chybět, uvedeným počtům odpovídá spektrum B **(3,0 b.)**.

3. Sekvence aminokyselin lidského ubiquitinu je:

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPD
QQLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRLLRGG

Aminokyselina		Počet	Aminokyselina		Počet	Aminokyselina		Počet
G	Gly	6	W	Trp	0	H	His	1
A	Ala	2	M	Met	1	P	Pro	3
V	Val	4	C	Cys	0	E	Glu	6
L	Leu	9	S	Ser	3	D	Asp	5
I	Ile	7	T	Thr	7	Q	Gln	6
F	Phe	2	R	Arg	4	N	Asn	2
Y	Tyr	1	K	Lys	7			

(2,0 b.)

4. ^1H - ^{15}N HSQC – Ubiquitin má 76 aminokyselin. Z páru H-N v peptidické vazbě přispívá jedním signálem každá aminokyselina kromě prolinu, který nemá na amidickém dusíku vázaný vodík. Kromě toho se v uvedené oblasti objeví signály ze skupin $-\text{NH}_2$ glutaminu a asparaginu. Tyto signály se vyskytují v párech se společnou frekvencí v dusíkové dimenzi (na jednom dusíku jsou vázány dva atomy vodíku).

Celkový počet signálů je tedy:

$$N(\text{HSQC}) = 76 - 3 + 2(6 + 2) = 89$$

Poznámka: Aminokupina první aminokyseliny na N-konci proteinu v peptidické vazbě vázaná není, místo ní je zde volná skupina $-\text{NH}_2$. Obě jádra vodíku jsou z hlediska NMR ekvivalentní v důsledku volné rotace kolem vazby C-N a signál vodíku nemusí být pozorovatelný v důsledku výměnné reakce s vodou. Pozorovatelnost tohoto signálu závisí na experimentálních podmínkách a nelze ji jednoznačně dopředu odhadnout. Řešení považuji za správné bez ohledu na to, zda tento signál započtete či nikoli.

^{13}C - ^{15}N CON – Výpočet je obdobný jako v případě HSQC spektra, ale nyní signály pocházejí z atomů dusíku vázaných na karbonyl. Peptidických vazeb je mezi 76 aminokyselinami 75, do uvedené oblasti spadají i signály z bočních řetězců glutaminu a asparaginu.

$$N(\text{CON}) = 75 + 6 + 2 = 83$$

Signály s chemickým posunem dusíku nad 130 ppm pocházejí od prolinu. Vzhledem k tomu, že v prolinu na dusíku amidu v peptidické vazbě není vázán vodík, signály se ve spektru HSQC neobjeví (**6,0 b.**).

5. Signály vně rozsahu spektra se objeví na frekvenci f plus nebo minus celistvý násobek spektrální šířky. V našem případě (**1,0 b.**):

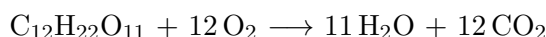
$$f' = (76,7 + 36,0) \text{ ppm} = 112,7 \text{ ppm}$$

Z4 – Pohádka o jaderné ponorce (čtvrtá doplňková úloha)

Autoři: Tomáš Fiala (e-mail: tom.fiala90@gmail.com)
 Lukáš Mikulů (e-mail: lukas.mikulu@seznam.cz)

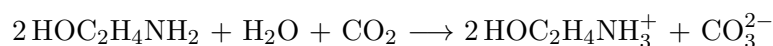
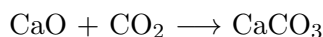
10 bodů

1. Vyčíslená rovnice reakce, která drží Ivany při životě (**0,25 b.**):

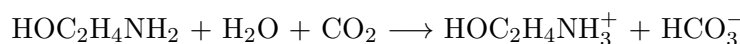


2. Energetická potřeba Ivana = 2800 kcal/den = 11,71 MJ/den
 Celková spotřebovaná energie = 11,71 MJ/den \times 125 osob \times 60 dní = 87,9 GJ
 Látkové množství sacharózy = (87,9 GJ)/(5640 kJ/mol) = 15,6 kmol
 Hmotnost sacharózy = 15,6 kmol \times 342,3 g/mol = 5,33 t (**2,0 b.**)

3. Vyčíslené rovnice uvedených lapačů s oxidem uhličitým:

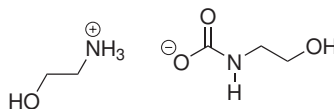


V přítomnosti většího množství CO_2 :



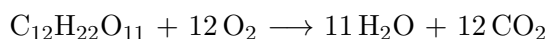
Velké části řešitelů dělalo problém vyčíslit rovnici reakce peroxidu lithného s oxidem uhličitým. Častokrát jsme v řešení objevovali uhličitán lithnatý (LiCO_3). Pakliže je to způsobeno tím, že neznáte peroxid lithný – i u rovnic s neznámou látkou byste měli pamatovat na zákon zachování hmotnosti a všechny rovnice si podle něj zkontrolovat.

U reakce ethanolaminu řada řešitelů „vyrobila“ karbamát:



V principu se s touto reakcí dá souhlasit, ale je třeba si uvědomit, že ve vodném roztoku (který byl v zadání), bude karbamát hydrolyzovat za vzniku uhličitanu. **0,75 b.**)

4. Všechny tři látky reagují s oxidem uhličitým v poměru 1:1, proto nejvýhodnější (nejmenší) poměr má látka s nejnižší molární hmotností, tedy Li_2O_2 ($M = 45,88$ g/mol). (**0,25 b.**)
5. Rovnice:



Z rovnice dýchání vyplývá, že na 1 mol sacharózy vzniká 12 mol CO_2 .

Látkové množství $\text{Li}_2\text{O}_2 = n(\text{CO}_2) = n(\text{sacharóza}) \times 12 = 15,6 \text{ kmol} \times 12 = 187 \text{ kmol}$.

Hmotnost $\text{Li}_2\text{O}_2 = 187 \text{ kmol} \times 45,88 \text{ g/mol} = 8,58 \text{ t}$ (**2,0 b.**).

6. 1 elektronvolt je definován jako kinetická energie, kterou získá jeden elektron urychlený napětím 1 volt. (**0,25 b.**)
7. Nejprve je třeba spočítat, kolik celkem palivový uran obsahoval energie.

práce = výkon \times čas

3 roky = $365,25 \times 24 \times 60 \times 60 \text{ s} = 9,47 \times 10^{10} \text{ s} = 94,7 \text{ Ms}$

výkon = $2 \times 70 \text{ MW}$

práce = výkon \times čas = $140 \text{ MW} \times 94,7 \text{ Ms} = 1,33 \times 10^{16} \text{ J}$

Tato vypočtená práce odpovídá energii, která byla účinně využita. Vyprodukovaná energie reaktoru je ve skutečnosti větší kvůli technologickým nedokonalostem. Abychom tedy získali větší energii, musíme účinností **dělit** a ne násobit.

Pak tedy:

celková energie získatelná z uranu = (výkon \times čas)/účinnost = $(140 \text{ MW} \times 94,7 \text{ Ms})/0,33 = 4,02 \times 10^{16} \text{ J}$

Následně vypočítáme, kolik jader uranu-235 se muselo pro uvolnění této energie rozštěpit.

Jedno jádro uvolní energii $193,4 \text{ MeV} = 3,10 \times 10^{-11} \text{ J}$

Celkový počet jader U-235 = $(4,02 \times 10^{16} \text{ J})/(3,10 \times 10^{-11} \text{ J}) = 1,30 \times 10^{27} = 2,15 \text{ kmol}$

Hmotnost uranu = $2,15 \text{ kmol} \times 235,012 \text{ g/mol} = 0,506 \text{ t}$

Hmotnostní zlomek obohacení = $m(\text{U-235})/m(\text{materiálu}) = (0,506 \text{ t})/(2,5 \text{ t}) = 0,20$

Hmotnostní procento = 20% (**2,0 b.**).

8. Hmotnost autorské baterie = 22 g

Jedním vztahem lze snadno spočítat, kolik kg Li-baterií je třeba na pohánění ponorky.

Hmotnosti Li-bateriek = práce / energetická hustota = $(1,33 \times 10^{16} \text{ J})/(1,8 \text{ MJ/kg}) = 2,23 \times 10^{10} \text{ kg}$

Počet Li-bateriek = celková hmotnost / hmotnost jedné baterky

Počet Li-bateriek = $(7,36 \times 10^9 \text{ kg})/(0,022 \text{ kg}) = 3,33 \times 10^{11}$ (= $0,55 \text{ pmol}$) (**2,5 b.**)

Doufáme, že jste při řešení naší úlohy nedostali mořskou nemoc ... nebo nemoc z ozáření...