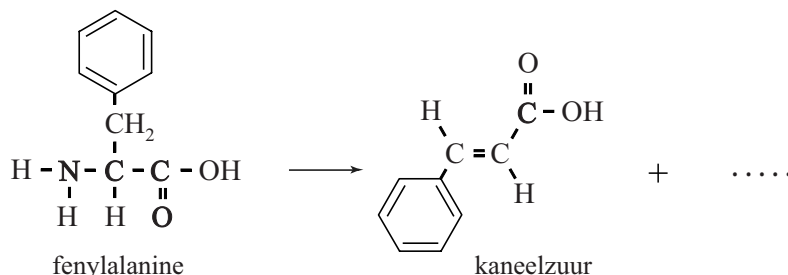


PAL is een enzym dat voorkomt in planten en micro-organismen. PAL zet het aminozuur fenylalanine om tot kaneelzuur. De omzetting van fenylalanine door PAL is in figuur 1 weergegeven met een onvolledige vergelijking.

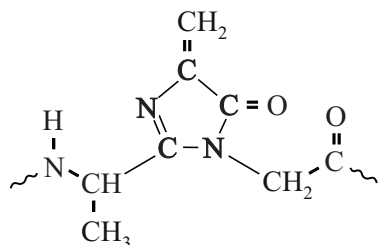
figuur 1



1p 1 Geef de formule van het ontbrekende deeltje.

Uit onderzoek naar de structuur van PAL bleek dat in PAL een opvallende kenmerkende groep aanwezig is: de zogeheten MIO-groep. De MIO-groep is in figuur 2 weergegeven. De MIO-groep wordt bij de synthese van PAL gevormd door ringsluiting van een deel van de eiwitketen dat kan worden weergegeven met  $\sim \text{Ala} - \text{Ser} - \text{Gly} \sim$ .

figuur 2



De eerste stap in de vorming van de MIO-groep is de sluiting van de in figuur 2 weergegeven vijfkring door een additiereactie binnen het enzymmolecuul. In de reacties die leiden tot MIO worden twee watermoleculen afgesplitst. Hierbij wordt onder andere de  $\text{C}=\text{C}$  binding gevormd.

4p 2 Geef de structuurformule van het gedeelte  $\sim \text{Ala} - \text{Ser} - \text{Gly} \sim$ . Geef in de structuurformule met een pijl/pijlen aan welke twee atomen met elkaar worden verbonden bij de ringsluiting. Omcirkel in de structuurformule de H atomen en de O atomen die bij de vorming van de MIO-groep worden afgesplitst.

De onderzoekers vermoedden dat de MIO-groep een rol speelt in de omzetting van fenylalanine tot kaneelzuur. Om vast te stellen welke aminozuureenheden nog meer een rol spelen bij de omzetting, hebben ze rondom de MIO-groep veranderingen aangebracht in de aminozuur-samenstelling van PAL. Wanneer op positie 110 het aminozuur Phe werd ingebouwd, bleek de gevormde PAL nauwelijks nog katalytische activiteit te vertonen. In actieve PAL is op plaats 110 de aminozuureenheid Tyr (Tyr110) aanwezig.

- 2p 3 Geef twee chemische redenen waarom Phe is gekozen als vervanger van Tyr110. Licht je antwoord toe, zodat duidelijk wordt waarom dit voor het onderzoek relevante redenen zijn.

Om deze PAL-variant te kunnen produceren, hebben de onderzoekers in een micro-organisme een puntmutatie aangebracht in het deel van het DNA dat codeert voor PAL. Een puntmutatie is de vervanging van een basenpaar in het DNA door een ander basenpaar. De code voor het eerste aminozuur van PAL begint bij het basenpaar met nummer 1.

- 3p 4 Geef de symbolen van het basenpaar van de puntmutatie, zowel voor de actieve PAL met Tyr110 als voor de inactieve PAL met Phe110. Gebruik Binas-tabel 71G.

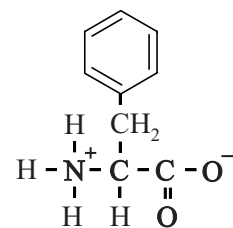
Noteer je antwoord als volgt en licht je antwoord toe:

	actieve PAL	inactieve PAL
base op coderende streng:	.....	.....
base op matrijsstreng:	.....	.....
Toelichting: .....		

- 2p 5 Geef aan wat het nummer is van het basenpaar van de puntmutatie. Licht je antwoord toe.

Het pH-optimum van PAL ligt bij pH = 8,80. Bij deze pH komen moleculen fenylalanine vooral voor in de vorm zoals hiernaast is weergegeven. De  $K_z$  van de  $\sim\text{NH}_3^+$  groep in fenylalanine bedraagt  $7,4 \cdot 10^{-10}$ .

fenylalanine (pH = 8,80)



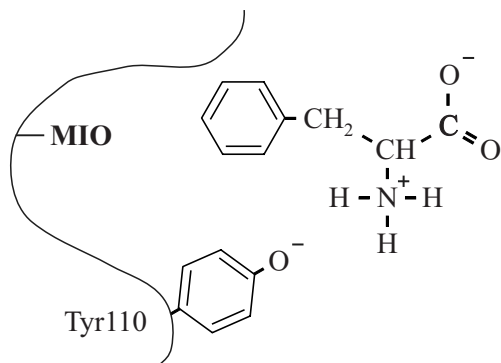
- 4p 6 Bereken hoeveel procent van de aminogroepen van fenylalanine aanwezig is als  $\sim\text{NH}_3^+$  bij pH = 8,80 ( $T = 298 \text{ K}$ ).

Nader onderzoek leidde uiteindelijk tot opheldering van de rol van de MIO-groep en van Tyr110 bij de omzetting van fenylalanine tot kaneelzuur. De volgende punten zijn vastgesteld:

- De MIO-groep bevindt zich in een holte van het enzym en katalyseert de omzetting van fenylalanine;
- de restgroep van Tyr110 bevindt zich bij de ingang van deze holte;
- bij het pH-optimum van PAL heeft de restgroep van Tyr110 een negatieve lading.

In figuur 3 is schematisch weergegeven hoe volgens de onderzoekers een fenylalanine-deeltje het actieve centrum van een molecuul PAL nadert.

**figuur 3**



Tyr110 oefent aantrekkende en afstotende krachten uit op atoomgroepen van een fenylalanine-deeltje. Door deze interacties wordt het fenylalanine-deeltje georiënteerd zoals in figuur 3 is weergegeven.

- 2p 7 Leg uit welke twee elektrostatistische interacties tussen een fenylalanine-deeltje en het Tyr110 ervoor zorgdragen, dat een fenylalanine-deeltje de holte binnengaat op de manier zoals is weergegeven in figuur 3. Geef ook aan welke atoomgroep van het fenylalanine-deeltje betrokken is bij elke afzonderlijke interactie.

In een meting bleek een monster van 148 mg onzuivere PAL de vorming van 158  $\mu\text{mol}$  kaneelzuur per minuut te katalyseren.

Het monster bestond voor 90 massa% uit PAL. De overige 10 massa% bestond uit enzymen zonder katalytisch effect op de reactie.

Met behulp van deze gegevens is het mogelijk de turnover frequency (TOF) te berekenen. De TOF is gedefinieerd als het aantal substraatmoleculen dat per minuut door één molecuul PAL kan worden omgezet.

- 3p 8 Bereken de TOF van PAL.  
De molaire massa van PAL bedraagt  $2,75 \cdot 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ .