

«Химические основы биологических процессов» *

Часть II. ХИМИЧЕСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

Текущие и рубежные вопросы.

ТЕМА 1

1. Роль водородных связей в стабилизации структуры белка. Примеры. Величины свободных энергий.
2. Какие химические составляющие ферментов участвуют в формировании гидрофобных взаимодействий? Экспериментальное определение величины гидрофобности.
3. Какие потенциальные участники электростатических взаимодействий имеются в белках? Исходя из закона Кулона рассмотрите влияние свойств среды на эффективность электростатических взаимодействий в белках.
4. Какие аминокислотные остатки чаще находятся на поверхности молекул белков (ферментов), а какие внутри белковой глобулы и почему?
5. Схематически изобразите кривую титрования аспарагиновой/глутаминовой кислоты. Оцените значения рК ионогенных групп.
6. Схематически изобразите кривую титрования лизина/аргинина. Оцените значения рК ионогенных групп.
7. Схематически изобразите кривую титрования гистидина. Оцените значения рК ионогенных групп.
8. Что такое изоэлектрическая точка белка и чем она определяется.
9. Если изоэлектрическая точка белка меньше 7, что это означает и как будет заряжена молекула такого белка при рН ниже 7, рН = 7 и при рН выше 7.
10. В чем состоят основные трудности при выделении биополимеров? Какие методы можно использовать?
11. На чем основано разделение белков фракционированием в присутствии разных концентраций солей. От каких примесей этот метод позволяет избавиться в первую очередь?
12. Какую информацию о белке можно получить из данных электрофореза? В чем отличие от метода изоэлектрофокусировки?
13. В чем принципиальное различие и сходство методов очистки белков с помощью гель-фильтрации и электрофореза?
14. По какому параметру разделяются белки в процессе гель-фильтрации? Ответ поясните.
15. В чем особенности ионообменной хроматографии белков? Принципы разделения. Примеры.
16. Основные методы определения чистоты препаратов белков.
17. Смесь глицина, валина, аспарагиновой кислоты, аргинина и треонина разделяли методом электрофореза при рН 6.0.

каково состояние ионизации данных аминокислот?

- какие соединения двигались к аноду?
- какие соединения двигались к катоду?
- какие соединения оставались на старте?

18. При каком значении рН будет достигнуто наиболее эффективное разделение методом электрофореза следующих белковых смесей:
 - сывороточный альбумин (рI =4.9) и гемоглобин (рI =6.8)

- миоглобин (pI =7.0) и химотрипсиноген (pI =9.5)
 - яичный овальбумин (pI =4.6) и уреазы (pI =5.0)?
19. Что такое ферменты? Из чего их выделяют?
 20. Для каких целей можно использовать химическую модификацию ферментов? Примеры модификации ферментов по различным группам.
 21. Примеры химической модификации ферментов по карбоксильной и по аминок-группам. В чем отличие метода химической модификации от посттрансляционной модификации?
 22. Перечислите основные типы посттрансляционной модификации белков. Приведите примеры.
 23. Что кроме белковой части может входить в состав фермента? Какова хим. роль таких соединений? Приведите примеры.
 24. Принципы, лежащие в основе классификации ферментов. Номер фермента. Примеры реакций, катализируемых ферментами класса гидролаз/оксидоредуктаз.

ТЕМА 2

1. Схема Михаэлиса-Ментен, вывод уравнения, физический смысл параметров
1. Экспериментальное определение кинетических параметров K_m и V_m . В каких единицах измеряются эти параметры?
2. Чему соответствует концентрация субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равна половине максимальной?
3. При какой концентрации субстрата скорость ферментативной реакции будет составлять 25% от максимальной, если константа Михаэлиса этой реакции равна 150 мкМ?
4. Известно, что ферментативная реакция подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Каков порядок реакции при а) $[S] \approx K_m$, б) $[S] \ll K_m$? в) $[S] \gg K_m$? Ответ поясните формулами и графиками.
5. Почему невозможно дискриминировать схемы Анри и Михаэлиса в стационарном режиме? Ответ поясните графиками и формулами.
6. Трехстадийная схема ферментативной реакции с образованием ацилфермента, понятие о лимитирующей стадии.
7. Физико-химические параметры, которыми можно охарактеризовать действие обратимого ингибитора. Определение типа и константы обратимого ингибирования из данных по зависимости скорости реакции от концентрации субстрата и ингибитора: конкурентный/неконкурентный/бесконкурентный тип.
8. При каком типе ингибирования действие обратимого ингибитора может быть ослаблено или устранено путем увеличения концентрации субстрата? Ответ проиллюстрируйте формулами и графиками.
9. При каком типе ингибирования действие обратимого ингибитора НЕ может быть ослаблено или устранено путем увеличения концентрации субстрата? Ответ проиллюстрируйте формулами и графиками.
10. Как и почему можно изменить (уменьшить) эффективность действия ингибитора в реакционной системе без использования дополнительных реагентов, если ингибитор - бесконкурентный? Ответ поясните формулами и графиками.

11. Задачи в энзимологии, которые можно решить с помощью применения ингибиторов
12. рН-зависимости ферментативных реакций. Определение рК функциональных групп фермента и фермент-субстратного комплекса.
13. Особенности температурных зависимостей ферментативных реакций по сравнению с неферментативными.
14. Каким образом экспериментально можно определить энергию активации ферментативной реакции?
15. На что может указывать излом в зависимости скорости ферментативной реакции от температуры в полулогарифмических координатах ($\lg k$ от $1/T$)?
16. Особенности ферментативного катализа. Концепция Фишера "ключ-замок". Механизм "напряжения".
17. В чем состоит принцип индуцированного соответствия фермента субстрату в ферментативном катализе?
18. На примере химотрипсина рассмотрите каталитические и сорбционные подцентры ферментов.
19. Изобразите схему «эстафетной передачи протона» для стадий ацилирования и деацилирования в катализе сериновыми протеазами.
20. В чем сходство и в чем различие строения активных центров и механизмов действия трипсина, химотрипсина и эластазы?
21. Каковы общие черты и различия в катализе химотрипсином и папаином?
22. Какую реакцию катализирует лизоцим? Каков механизм действия этого фермента?
23. Какую функцию выполняет аспарагиновая кислота в катализе пепсином?
24. Какую функцию выполняет гистидин в катализе рибонуклеазой?
25. Карбоксипептидаза как пример металлзависимых протеаз: поясните роль металла в механизме катализа.

ТЕМА 3

1. Основные направления инженерной энзимологии. Примеры.
2. Физическая (нековалентная) иммобилизация ферментов.
3. Назовите способы получения водорастворимых стабилизированных препаратов ферментов.
4. Методы ковалентной иммобилизации. Какие химические группы молекул ферментов вовлекают в реакции (дать примеры используемых реакций)
5. Как изменится рН-зависимость активности фермента иммобилизованного на полианионном/поликатионном носителе? Почему?
6. На что указывает отсутствие зависимости или слабая зависимость от температуры скорости реакции, катализируемой иммобилизованным ферментом?
7. Ферменты в промышленности. Синтез антибиотиков как пример промышленного использования ферментов.
8. Использование ферментов в бытовых препаратах.
9. Типы и средства транспорта в живых системах.
10. Лекарственные средства и их основные мишени.

11. Нестероидные противовоспалительные средства.
12. Противомикробные лекарственные средства.
13. В чем заключается антибактериальное действие лизоцима?
14. Инсулин и его роль в поддержании уровня глюкозы в организме.
15. Лекарственные препараты – эффекторы (активаторы и ингибиторы) ферментов.
16. Какова роль В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов в специфическом иммунитете?
17. Какова структура иммуноглобулинов и их роль в иммунном ответе?
18. Что собой представляет антиген? Какие вещества могут являться антигеном?
19. Приведите и поясните схему сэндвич-метода ИФА.
20. Билюминисцентный анализ. Принцип метода. Использование.
21. Ферменты как элементы биосенсоров. Принцип действия ферментных электродов.

ИТОГОВЫЕ ВОПРОСЫ

1. Ферменты как природные катализаторы. Основные отличия ферментативного катализа от традиционного химического. Ферменты в химии.
2. Источники ферментов. Нахождение ферментов в природных объектах,

локализация ферментов в клетке.

3. Биосинтез ферментов. Посттрансляционная модификация.

Сборка ферментов. Кофакторы и простетические группы.

4. Методы выделения биополимеров: особенности и трудности. Методы фракционирования белков. Хроматография, электрофорез и изоэлектрическая фокусировка. Критерии чистоты ферментных препаратов
5. Энергия и силы в биосистемах. Взаимодействия в белковой молекуле: ковалентные, водородные связи, гидрофобные и электростатические взаимодействия.
6. Уровни структурной организации белков: первичная, вторичная, третичная и четвертичная структуры, понятие о сверхвторичных структурах и доменах.
7. Стабильность белков (ферментов). Денатурация и инактивация. Принципы стабилизации ферментов
8. Химическая модификация белков (ферментов). Виды ферментных препаратов.
9. Классификация ферментов.
10. Стационарная кинетика ферментативных реакций. Методы обработки экспериментальных данных.
11. Кинетические схемы Михаэлиса и Анри, их дискриминация.
12. Трехстадийная схема ферментативного катализа. Константы скорости в элементарных стадиях ферментативного катализа. Лимитирующие стадии ферментативных реакций.
13. Ингибирование ферментов. Обратимые и необратимые ингибиторы. Основы ингибиторного анализа.
14. Влияние рН на скорость ферментативной реакции, рН-зависимости кинетических параметров.

15. Температурные зависимости скоростей ферментативных реакций. Термоинактивация ферментов.
16. Активные центры ферментов. Каталитические и сорбционные подцентры ферментов. Основные структурные элементы. Специфичность и эффективность ферментативного катализа.
17. Физикохимические причины ускорения ферментативных реакций. Эффекты сближения и ориентации, усиление реакционной способности в ансамблях функциональных групп, эффекты среды. Теории ферментативного катализа.
18. Общий кислотно-основной катализ в механизме действия ферментов. Промежуточные соединения в ферментативном катализе.
19. Активные центры ферментов и механизмы катализируемых реакций. Понятия о химических механизмах действия α -химотрипсина, трипсина, эластазы, папаина, пепсина, лизоцима, карбоксипептидазы, рибонуклеазы, карбоангидразы.
20. Прикладная энзимология, основные направления развития и области практического использования ферментов. Биоконверсия вещества и энергии.
21. Имобилизованные биокатализаторы. Носители и методы иммобилизации. Основные характеристики иммобилизованных ферментов.
22. Использование ферментов в химическом синтезе. Принципы конструирования реакционных систем.
23. Использование ферментов в химическом анализе и медицинской диагностике. Иммуоферментный анализ. Билюминесцентный анализ. Биосенсоры.
24. Ферменты в медицине. Лекарственные препараты на основе ферментов и их регуляторов.
25. Основные мишени действия лекарственных препаратов.
26. Ферменты антибактериального действия. Особенности строения клеточной стенки бактерий.
27. Нестероидные противовоспалительные препараты.
28. Транспорт в живых системах. Рецепторы и системы передачи сигнала. Понятие о гормональной регуляции.
29. Механизмы обеспечения целостности организма и иммунитет.
30. Инженерия биокатализаторов и биокаталитических систем.

* Примечание – текущий контроль используется в случае, если в план занятий вводятся семинары.

Вопросы подготовили преподаватели и научные сотрудники кафедры химической энзимологии д.х.н., проф. Левашов А.В., д.х.н., проф. Клячко Н.Л., д.х.н., проф. Варфоломеев С.Д., д.х.н., проф. Тишков В.И., к.х.н., доцент Казанков Г.М., к.х.н., с.н.с. Кудряшова Е.В., м.н.с. Смирнов С.А.