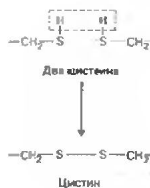
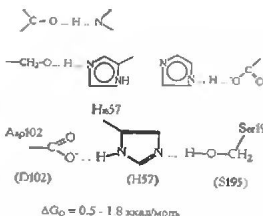


Вопрос 2. Энергия и силы в биосистемах:

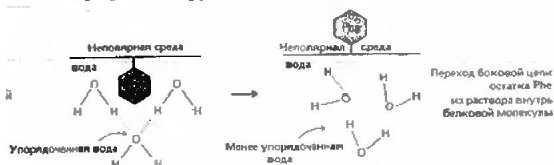
- Ковалентные связи
 - Пептидные связи
 - Дисульфидные мостики



- Водородные связи



- Гидрофобные связи возникают за счет перестройки систем водородных связей воды вблизи неполярной гидрофобной группы

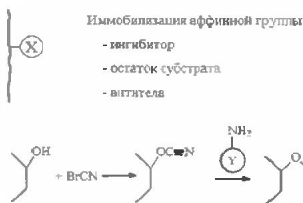


- Электростатические взаимодействия



Вопрос 4: Методы выделения биополимеров:

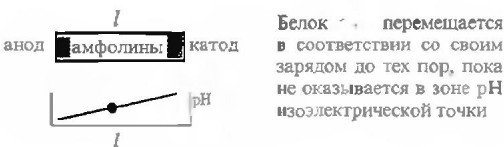
- Основные трудности
 - Большое разнообразие и незначительные различия в структуре
 - Малые количества исследуемого вещества (миллиграммы, микрограммы)
 - Неустойчивость, лабильность структур
- Методы фракционирования:
 - Органические растворители (уменьшение растворимости белков и НК)
 - Соли (сульфат аммония) - уменьшение электростатического отталкивания одноименно заряженных полиионов
 - Дробное осаждение
 - Центрифугирование
 - Гель-фильтрация («молекулярные сита») - различие в проницаемости и молекулярной подвижности в гелях для молекул различных размеров
 - Диализ - отделение от низкомолекулярных компонентов
 - Ультрафильтрация
- Виды хроматографии:
 - Аффинная хроматография - основана на избирательном взаимодействии с лигандом, связанным с инертным носителем. Лиганд - субстрат, кофермент, ингибитор. Главная особенность, обуславливающая высокую эффективность аффинной хроматографии, состоит в том, что разделение основано не на различие физ.-хим. признаков молекулы, а специфич. функциональных св-в.



4. Электрофорез



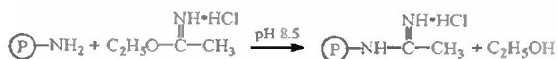
5. Изoeлектрическая фокусировка



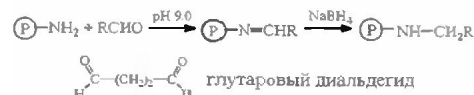
Вопрос 5. Химическая модификация белков. Применение для иммобилизации:

N-концевая альфа-аминогруппа, ε-аминогруппа лизина.

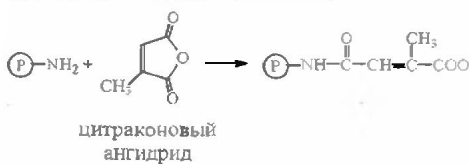
Имидозиферы



Альдегиды с последующим восстановлением боргидридом натрия

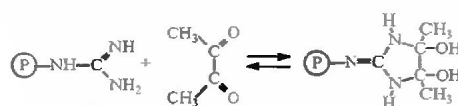


Ангидриды дикарбоновых кислот



Гуанидиногруппа аргинина

Бутандион

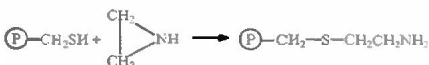


SH группа цистеина

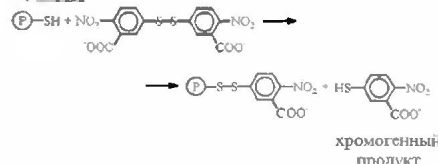
Бромуксусная кислота



Этиленimina



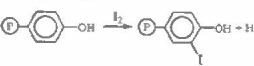
Реагент Эдмана - Дитиобиснитробензойная кислота (DNTB)



хромогенный продукт

Тирозин

Йодирование

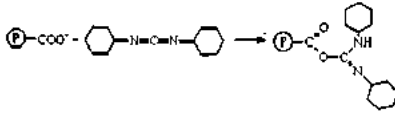


Нитрование



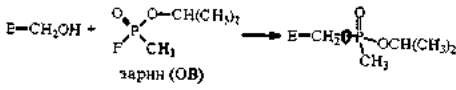
Концевая карбоксильная группа, карбоксильные группы аспаргиновой и глутаминовой кислот

Циклокарбонид

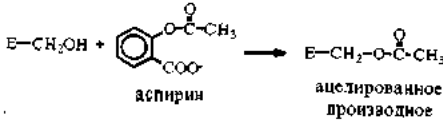


Специфическая модификация каталитически активных групп активного центра

Ацетилхолинэстераза

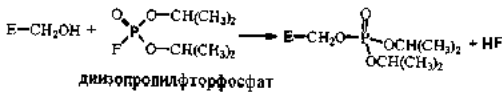


Простагландин-Н-синтетаза



Сериновые протеиназы

- α-химотрипсин (Ser 95)
- трипсин
- тромбин
- плазмин (плазминоген)



3. Гидролазы (EC3):

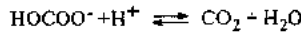
4 типа протеолитических ферментов, классифицированных по структуре активного центра

- сериновые - аспартатные
- цистеиновые - металисодержащие

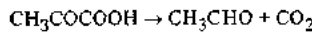
- целлюлазы: гидролиз целлюлозы
- нуклеазы
- ДНКазы: гидролиз ДНК
- РНКазы: гидролиз РНК
- амилазы: гидролиз крахмала

4. Лигазы (EC4) – присоединение групп по двойным связям и обратные реакции:

Карбангидраза

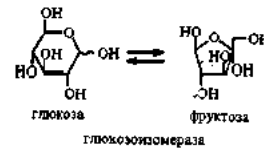
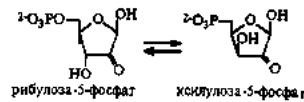


Пируватдекарбоксилаза



5. Изомеразы (EC5) – перенос групп внутри молекулы с образованием мезомерных форм:

- рибозы
- эпимеразы

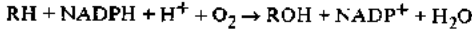


Вопрос 6. Классификация ферментов:

1. Оксидоредуктазы (EC1) – OBR.

Моноксидазы

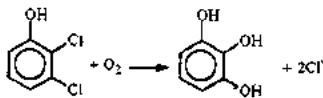
окисление органических соединений с включением одного атома кислорода в молекулу соединения и восстановление второго до воды



цитохромы P 450
гидроксилирование чуждых соединений (ксенобиотиков)

Дноксигеназы

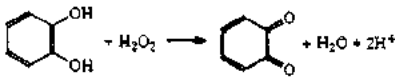
оба атома кислорода включаются в состав продукта



биотрансформация хлорорганических ароматических соединений

Пероксидазы

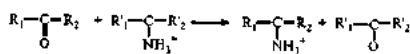
окисление пероксидом водорода



2. Трансферазы (EC2) – перенос метильной, ацетильной, фосфатной и др. групп.

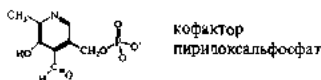
Аминотрансферазы

или Трансминазы

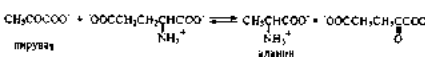


(кетокислоты) (аминокислоты)

перенос аминогруппы



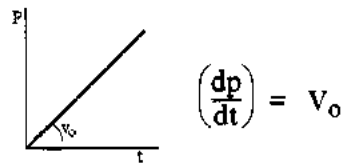
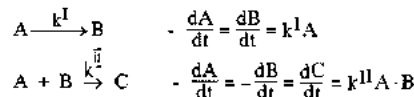
кофактор пиридоксальфосфат



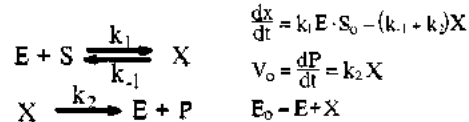
аланинаминотрансфераза

Вопрос 7. Стационарная кинетика ферментативных реакций.

1. Базовые уравнения химической кинетики



2. Схема Михаэлиса:

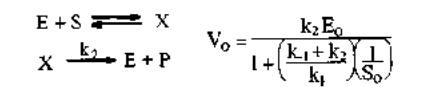


В стационарном режиме $\frac{dx}{dt} = 0$

$$\begin{cases} k_1 E \cdot S_0 - (k_{-1} + k_2) X \\ E_0 = E + X \end{cases} \quad E = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 S_0} X$$

$$E_0 = X + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 S_0} X = \left(1 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 S_0}\right) X$$

$$X = \frac{E_0}{1 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 S_0}} \quad V_0 = k_2 X = \frac{k_2 E_0}{1 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 S_0}}$$



$$V_0 = \frac{k_2 E_0}{1 + \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}\right) \left(\frac{1}{S_0}\right)}$$

$$V_0 = \frac{k_2 E_0 \cdot S_0}{K_m + S_0}$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

константа Михаэлиса.

Если $k_{-1} \gg k_2$ $K_m = \frac{k_{-1}}{k_1}$

константа диссоциации фермент-субстратного комплекса

$$V_m = k_{cat} \cdot E_0 \quad k_2 = k_{cat}$$

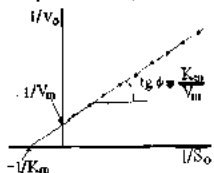
$$V_0 = \frac{V_m S_0}{K_m + S_0} \quad \text{Michaelis, Menten 1913}$$

$$V_m = k_{cat} \cdot E_0$$

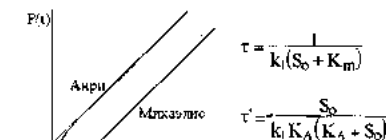
$$V_0 = \frac{V_m}{2}$$

$$(S_0)_{V_0 = \frac{V_m}{2}} = K_m$$

Определение V_m и K_m из экспериментальных данных



$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + S_0}{V_m \cdot S_0} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{S_0} + \frac{1}{V_m}$$

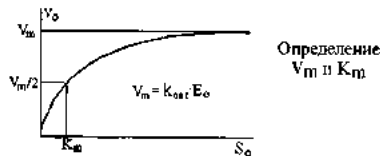


Михаэлиса: увеличение скорости по мере накопления X

Анри: уменьшение скорости по мере накопления X и расхода E

Экспериментальное определение K_m и V_m в стационарном режиме:

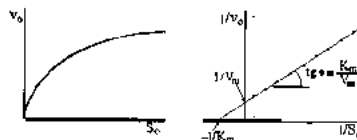
$$V_0 = \frac{K_{cat} E_0 \cdot S_0}{K_m + S_0} \quad \text{уравнение Михаэлиса}$$



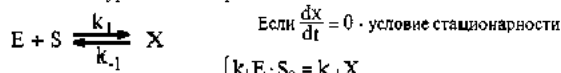
Определение V_m и K_m

Метод Лайкувера-Берка

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{S_0} \quad \text{двойные обратные координаты.}$$



4. Схемо и уравнение Анри:

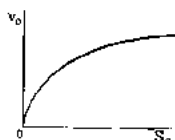


$$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} X \quad \begin{cases} k_1 E \cdot S_0 = k_{-1} X \\ E + X = E_0 \end{cases} \quad \begin{aligned} x &= \frac{k_1 S_0 E}{k_{-1}} \\ E &= \frac{E_0}{1 + \frac{k_1 S_0}{k_{-1}}} \end{aligned}$$

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = k_1 E \cdot S_0 - k_{-1} X \\ V_0 = \frac{dp}{dt} = k_2 E \cdot S_0 \\ E_0 = E + X \end{cases} \quad \begin{aligned} E_0 &= E + \frac{k_1 S_0 E}{k_{-1}} \\ E &= \frac{E_0}{1 + \frac{k_1 S_0}{k_{-1}}} \\ V_0 &= k_2 E_0 \cdot E = \frac{k_2 \cdot E_0 \cdot S_0}{\left(\frac{k_{-1}}{k_1}\right) S_0 + 1} = \frac{k_2 K_A \cdot E_0 \cdot S_0}{K_A + S_0} \end{aligned}$$

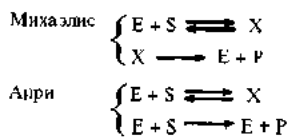
$$\frac{1}{K_A} = \left(\frac{k_{-1}}{k_1}\right)$$

$$V_0 = \frac{K_A \cdot K_A \cdot E_0 \cdot S_0}{K_A + S_0}$$



Экспериментально та же зависимость начальной скорости от концентрации субстрата, что и в случае схемы Михаэлиса

Механизмы различны



Стационарное приближение не дает возможности дискриминировать эти механизмы.

Вопрос 8: Дискриминация механизмов Михаэлиса и Анри.

Дискриминация схем Анри и Михаэлиса из предстационарной кинетики

Механизмы Михаэлиса и Анри могут быть дискриминированы при исследовании кинетики ферментативной реакции в нестационарном режиме

Схема Михаэлиса

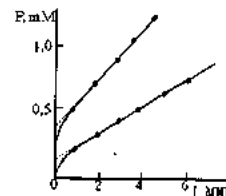
$$P(t) = \frac{k_2 E_0 S_0}{K_m + S_0} t + \frac{k_2 E_0 S_0}{(S_0 + K_m)(k_1 S_0 + k_{-1} + k_2)} \left\{ e^{-k_1(S_0 + K_m)t} - 1 \right\}$$

Схема Анри

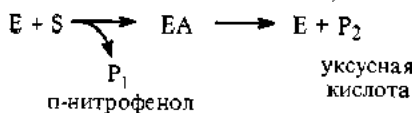
$$P(t) = \frac{K_A K_A E_0 S_0 t}{K_A + S_0} - \frac{k_2 E_0 S_0^2}{(K_A - S_0) k_1} \left\{ e^{-k_1(S_0 + K_A)t} - 1 \right\}$$

Вопрос 9. Трехстадийная схема ферментативного катализа.

Хартли и Килби (Hartley, Kilbi, 1951), исследуя кинетику гидролиза п-нитрофенолового эфира уксусной кислоты, обнаружили две стадии.

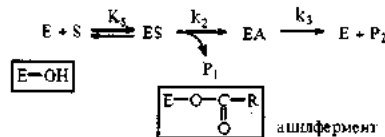


Простейшее объяснение



Сернистые протеазы (химотрипсин, трипсин, плазмин, тромбин и др.)

Промежуточный ацилфермент

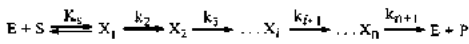


$$k_{cat} = \frac{k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3}, \quad K_m = \frac{K_A \cdot k_3}{k_2 + k_3}$$

$k_2 \gg k_3$, $k_{cat} = k_3$
лимитирует деацилирование

$k_3 \gg k_2$, $k_{cat} = k_2$
лимитирует ацилирование

Механизм реакций с участием произвольного числа n промежуточных соединений:



$$V_o = \left(\frac{dp}{dt} \right)_{c, \tau} = k_{n+1} X_n = k_2 X_1$$

$$\frac{dx_2}{dt} = k_2 X_1 - k_3 X_2 = 0 \quad k_2 X_1 = k_3 X_2$$

$$\frac{dx_i}{dt} = k_i X_{i-1} - k_{i+1} X_i = 0 \quad k_i X_{i-1} = k_{i+1} X_i$$

$$\frac{dx_n}{dt} = k_n X_{n-1} - k_{n+1} X_n = 0 \quad k_n X_{n-1} = k_{n+1} X_n$$

$$X_1 = \frac{E \cdot S_0}{K_s} \quad X_i = X_{i-1} \left(\frac{k_i}{k_{i+1}} \right) = X_1 \left(\frac{k_2}{k_{i+1}} \right)$$

$$E_0 = E + \sum_{i=1}^n X_i \quad i = 2, \dots, n$$

$$V_o = \frac{k_{cat} E_0 \cdot S_0}{K_m + S_0}$$

$$k_{cat} = \frac{1}{\sum_{j=2}^{n+1} \frac{1}{k_j}}$$

$$K_m = \frac{K_s}{k_2} \cdot \frac{1}{\sum_{j=2}^{n+1} \frac{1}{k_j}}$$

В стационарной кинетике реакций проявляется наиболее медленная, лимитирующая стадия

Если $k_j \ll k_i \quad i = 2, \dots, n, \quad i \neq j \quad k_{cat} = k_j$

$$K_m = \frac{K_s k_j}{k_2}$$

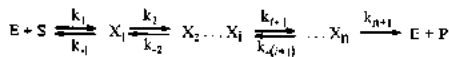
Если константы скорости двух наиболее медленных процессов соизмеримы по величине

$$k_i \sim k_j \quad k_i, k_j \ll k_m$$

$$k_{cat} = \frac{1}{\frac{1}{k_i} + \frac{1}{k_j}} = \frac{k_i k_j}{k_i + k_j}$$

$$K_m = \frac{K_s}{k_2} \cdot \frac{k_j k_i}{k_j + k_i}$$

Предстационарная кинетика



$$E_0 = E + \sum_{i=1}^n X_i$$

$$\frac{dp}{dt} = k_{n+1} X_n$$

$$\frac{dX_1}{dt} = k_1 S_0 E + k_2 X_2 - (k_{-1} + k_2) X_1$$

$$\frac{dX_i}{dt} = k_i X_{i-1} + k_{-(i-1)} X_{i-1} - (k_i + k_{i+1}) X_i$$

$$\frac{dX_n}{dt} = k_n X_{n-1} - (k_n + k_{n+1}) X_n$$

Методом исключения переменных система сводится к дифференциальному уравнению n-ого порядка с постоянным коэффициентом

$$\frac{d^n X_n}{dt^n} + a_1 \frac{d^{n-1} X_n}{dt^{n-1}} + \dots + a_n X_n = b$$

Решением является сумма экспоненциальных членов

$$X_n(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{\lambda_i t} + \frac{b}{a_n}$$

Характеристическое уравнение

$$\lambda^n + a_1 \lambda^{n-1} + \dots + a_n = 0$$

λ_i - корни характеристического уравнения, имеющие размерность обратного времени.

$$\tau_i = -\frac{1}{\lambda_i}$$

$$\frac{dp}{dt} = k_{n+1} X_n$$

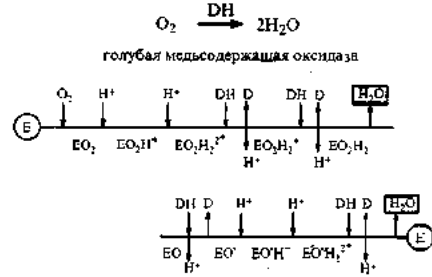
$$P(t) = \sum_{i=1}^n k_{n+1} \frac{A_i}{\lambda_i} (e^{\lambda_i t} - 1) + \frac{k_{n+1} B}{a_n} t$$

1. После протекания реакции в нестационарном режиме реакция переходит в стационар

$$V_{c, \tau} = \frac{k_{cat} B}{a_n}$$

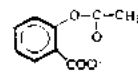
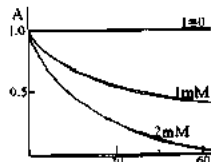
2. Число наблюдаемых экспонент на кинетических кривых соответствует числу промежуточных соединений в механизме реакции

Путь от субстрата к продукту протекает через образование лабильных промежуточных соединений субстрата (продукта) и функциональных групп активного центра



Вопрос 11. Ингибирование ферментов.

Необратимое ингибирование - образование прочной химической связи ингибитора с функционально важными группами активного центра фермента



ацетилсалициловая кислота (аспирин) необратимый ингибитор простагландин-Н-синтазы

Обратимое ингибирование - образование комплексов ингибитора с функционально важными группами активного центра фермента

1. Конкурентное



$$E_0 \ll S_0, \quad E_0 \ll I_0$$



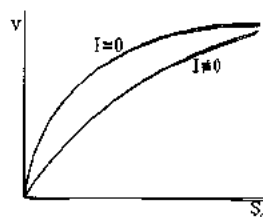
$$K_i = \frac{E \cdot I_0}{EI} \quad E_j = \frac{E \cdot I_0}{K_i} \quad K_m = \frac{E \cdot S_0}{ES}; \quad ES = \frac{E \cdot S_0}{K_m}$$

$$V_o = \left(\frac{dp}{dt} \right) = k_{cat} ES = \frac{k_{cat} E \cdot S_0}{K_m}$$

$$E_0 = E + ES + EI = E \left(1 + \frac{S_0}{K_m} + \frac{I_0}{K_i} \right)$$

$$V_o = \frac{k_{cat} \cdot S_0}{K_m} \cdot \frac{E_0}{1 + \frac{S_0}{K_m} + \frac{I_0}{K_i}} = \frac{k_{cat} E_0 S_0}{K_m \left(1 + \frac{I_0}{K_i} \right) S_0}$$

$$V_o = \frac{k_{cat} \cdot S_0}{K_m} \cdot \frac{E_0}{1 + \frac{S_0}{K_m} + \frac{I_0}{K_i}} = \frac{k_{cat} E_0 S_0}{K_m \left(1 + \frac{I_0}{K_i} \right) S_0}$$

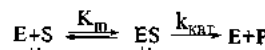


Ингибитор не влияет на $V_m = k_{cat} E_0$.

уменьшает скорость реакции, увеличивая наблюдаемое значение K_m

Анальгин - конкурентный обратимый ингибитор простагландин-Н-синтазы

2. Неконкурентное



комплекс ESI неактивен

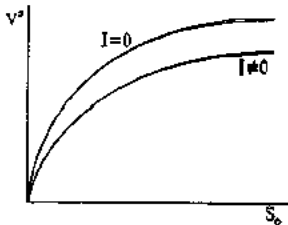
$$E_0 = E + ES + EI + ESI$$

$$V_0 = \left(\frac{dp}{dt}\right) = k_{кат} ES = \frac{k_{кат} E \cdot S_0}{K_m}$$

$$ES = \frac{E \cdot S_0}{K_m}; \quad EI = \frac{E \cdot I_0}{K_i}; \quad ESI = \frac{E \cdot I_0 \cdot S_0}{K_m \cdot K_i}$$

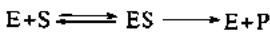
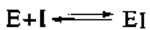
$$E_0 = E \left(1 + \frac{S_0}{K_m} + \frac{I_0}{K_i} + \frac{I_0 \cdot S_0}{K_m \cdot K_i}\right)$$

$$V_0 = \frac{k_{кат} S_0}{K_m} \cdot \frac{E_0}{\left(1 + \frac{S_0}{K_m} + \frac{I_0}{K_i} + \frac{I_0 \cdot S_0}{K_m \cdot K_i}\right)} = \frac{\frac{k_{кат} E_0 \cdot S_0}{1 + \frac{I_0}{K_i}}}{K_m + S_0}$$

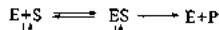


Ингибитор влияет на максимальную скорость реакции, не влияет на значение наблюдаемой K_m

Обратимое ингибирование: дискриминация механизмов

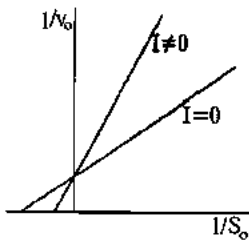


конкурентное ингибирование

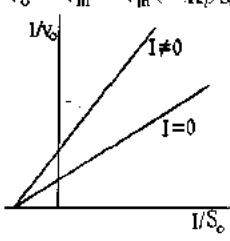


неконкурентное ингибирование

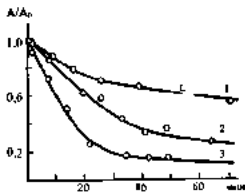
$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{I_0}{K_i}\right) \cdot \frac{1}{S_0}$$



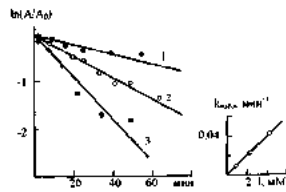
$$\frac{1}{V_0} = \frac{1 + \frac{I_0}{K_i} + \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{I_0}{K_i}\right) \cdot \frac{1}{S_0}}{V_m}$$



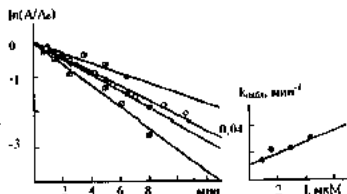
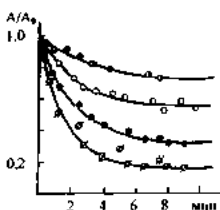
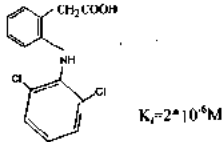
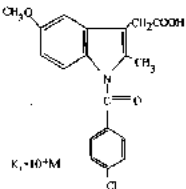
Аспирин – медленный ингибитор простагландинсинтазы



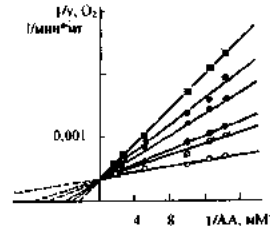
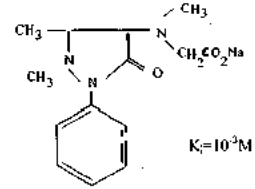
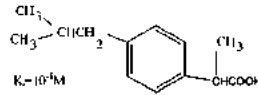
необратимый ингибитор



Индометацин и вольтарен – медленные обратимые ингибиторы простагландинсинтазы

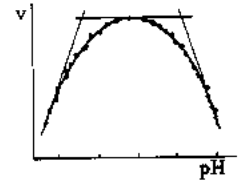
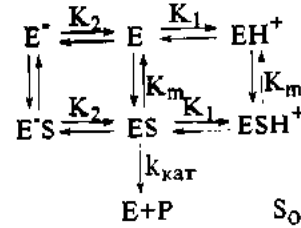


Бруфен и анальгин – быстрые обратимые ингибиторы простагландинсинтазы



Вопрос 12. Влияние pH.

Протон – как ингибитор и активатор фермента



$$V_0 = \left(\frac{dp}{dt}\right) = k_{кат} ES = \frac{k_{кат} E \cdot S_0}{K_m}$$

$$E_0 = E + EH^+ + E^- + ES + ESH^+ + ES^-$$

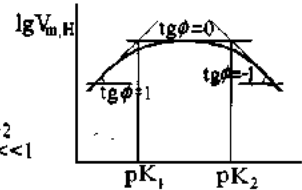
$$K_1 = \frac{E \cdot H^+}{EH^+}; \quad K_2 = \frac{E^- \cdot H^+}{E}$$

$$S_0 = E \left(1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{H^+}\right) + ES \left(1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{H^+}\right) = E \left(1 + \frac{S_0}{K_m}\right) \left(1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{H^+}\right)$$

$$E = \frac{E_0}{\left(1 + \frac{S_0}{K_m}\right) \left(1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{H^+}\right)}$$

$$V_0 = \frac{k_{кат} S_0}{K_m} \quad E = \frac{k_{кат} E_0 \cdot S_0}{(K_m + S_0) \left(1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{H^+}\right)}$$

$$V_{m,H} = \frac{V_m}{1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{H^+}}$$



1. "Кислая" область $H^+ \gg K_1$ $H^+ \gg K_2$
 $H^+/K_1 \gg 1$ $K_2/H^+ \ll 1$

$$V_{m,H} = \frac{V_m K_1}{H^+}$$

$$\lg V_{m,H} = \text{const} - \lg H^+$$

2. Нейтральная область $H^+ \ll K_1$ $H^+ \gg K_2$

$$V_{m,H} = V_m$$

$$\lg V_{m,H} = \text{const} + \lg H^+$$

3. "Щелочная" область $H^+ \ll K_1$ $H^+ \ll K_2$
 $H^+/K_1 \ll 1$ $K_2/H^+ \gg 1$

Вопрос 10. Температурная зависимость скоростей ферментативных реакций.

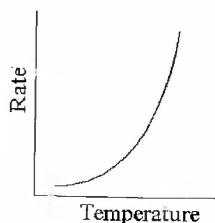
Зависимость $k_{\text{тп}}$ от температуры:

$$k(T) = \frac{kT}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}}$$

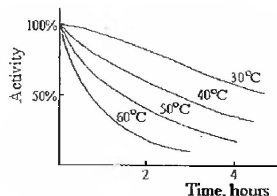
10° → 2-5 times

$$\Delta H^\ddagger \approx 25 \text{ kcal}$$

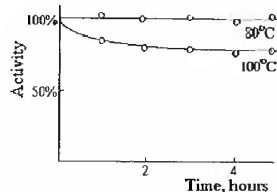
$$k_{90^\circ} / k_{20^\circ} = 13000$$



Кинетика инактивации ферментов:



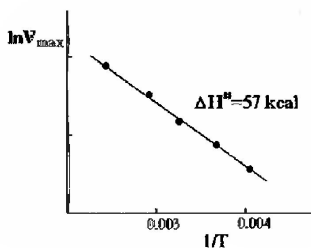
$$A(t) = A_0 e^{-k_{\text{ин}}(T)t}$$



$$k(T) = \frac{kT}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}}$$

Скорость инактивации уменьшается посредством стабилизации фермента с помощью образования водородных и дисульфидных связей и электростатического взаимодействия.

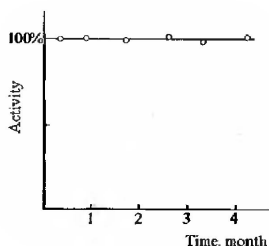
Ферменты из термофильных организмов:



Высокая стабильность
Высокая энергия активации
Ферменты из термофилов обычно при комнатной температуре проявляют низкую активность
Пример: Гидрогеназа- фермент, активирующий молекулу водорода:

- Применение: Фермент топливных элементов
- Системы биофотоллиза воды
- Конверсия топлив
- Биокаталитическое восстановление CO₂

Стабильность гидрогеназы в кипящей воде:



Вопрос 13. Активные центры ферментов:

Активный центр включает два подцентра

- Каталитический
- Сорбционный

Наличие каталитического и сорбционного подцентров следует из кинетических данных по ингибированию ферментов и данных рентгеноструктурного анализа

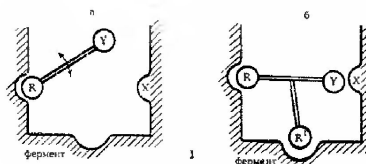
Каталитический центр осуществляет химическую трансформацию субстратов

Сорбционный центр определяет выбор субстрата и ответственен за специфичность фермента

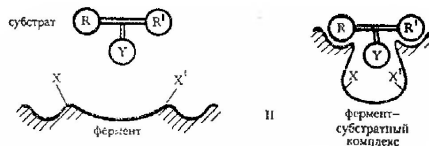
Специфичность и эффективность ферментативного катализа:

Механизмы, которые могут объяснить постоянство суммарной свободной энергии сорбции при одновременном понижении свободной энергии активации химического превращения фермент-субстратного комплекса:

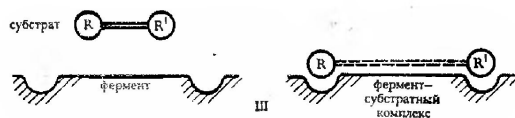
I-эффекты сближения и ориентации



II-механизм индуцированного соответствия



III-механизм «напряжения»



Фишер. Концепция «ключ-замок»

Концепция «дыбы». Фермент активирует субстрат, «растягивая» и дестабилизируя реагирующие связи.

Концепция индуцированного соответствия. «Хороший» субстрат организует активный центр. «Плохой» субстрат не вызывает конформационных изменений.

Вопрос 14. Методы биоинформатики.

Сравнение последовательности белков в больших семействах:

Сопоставление аминокислотных последовательностей близкородственных белков на примере цитохромов P450 семейства CYP51

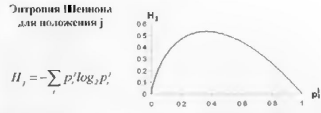
...EMDVLVRCIKKALRLHPLI... растения
 ...ELNLLRCIKETLRLRPFM... млекопитающие
 ...QIRQLENVLKETLRLHPLI... бактерии

Виды выравниваний

- парное локальное выравнивание
- нечетное общее с пропусками
- множественное локальное выравнивание
- множественное общее с пропусками

Вероятность нахождения i-аминокислоты в положении j

$$P_i^j = \frac{n_i^j}{\sum_i n_i^j}$$



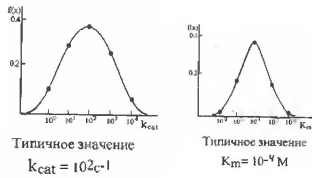
Каталитически важные группы выявляются как консервативные аминокислоты при множественном выравнивании последовательностей аминокислот в семействах ферментов. Наиболее важной аминокислотой при формировании активных центров является глицин. Аспарагиновая кислота, гистидин, аргинин, наиболее часто встречается в активных центрах ферментов и «работают» как нуклеофильно-электрофильные агенты. Цистеин и пролин – структурообразующие аминокислоты, необходимые при формировании архитектуры активных центров.

Вопрос 15. Константы скорости в элементарных стадиях ферментативного катализа.

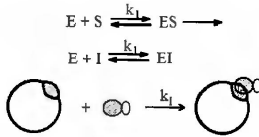
Характерные значения k_{cat} и K_m :

Выборка около 500 ферментов

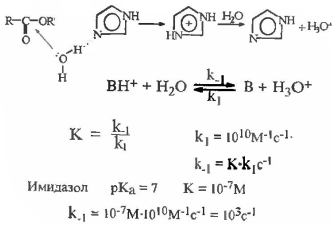
Значения констант разбиты на группы с приблизительно одинаковыми значениями k_{cat} и K_m в пределах одного порядка, подсчитано число ферментов в каждой группе. Это число отнесено на общее число ферментов в выборке. Таким образом найдена функция распределения ферментов относительно параметров k_{cat} и K_m .



Бимолекулярные стадии:



Реакции переноса протона:



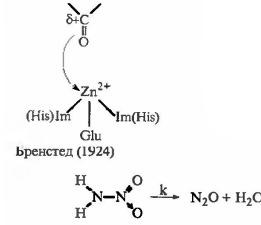
Реакции переноса протона могут быть лимитирующими стадиями ферментативного катализа

Вопрос 16. Общий кислотно-основной катализ в механизме действия ферментов

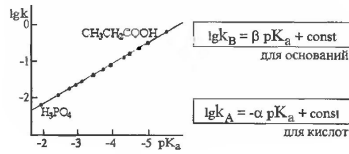
Общий основной катализ Общий кислотный катализ



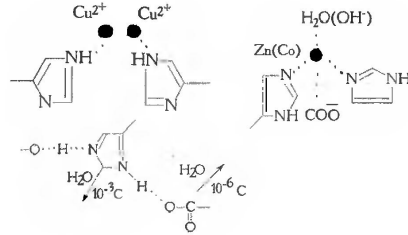
Электрофильный катализ



Разложение нитрамида катализируется анионами кислот

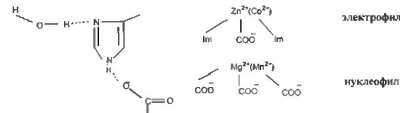


«Элементарная база» в ферментативном катализе:



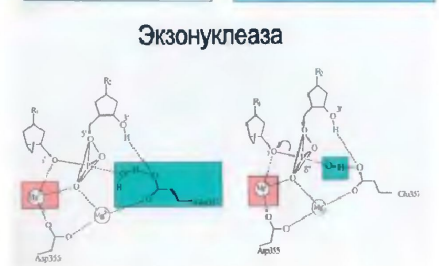
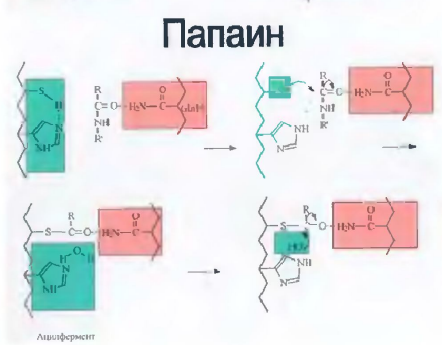
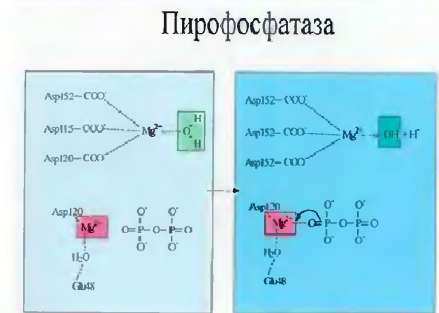
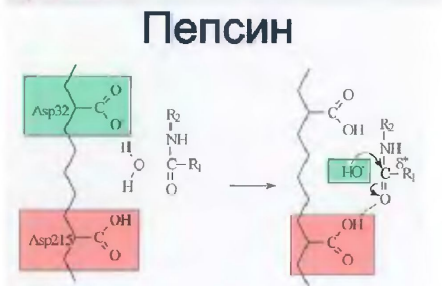
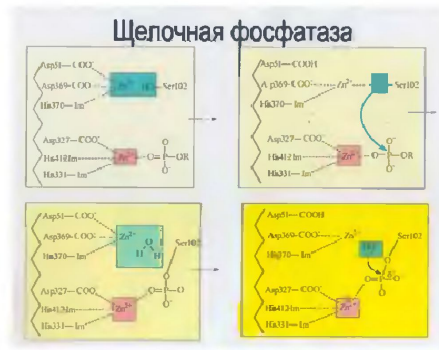
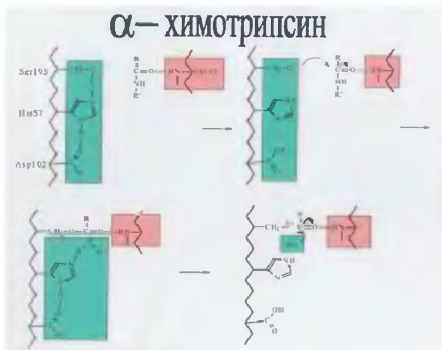
Имидазольная группа гистидина – проводник протона, медиатор влияния нуклеофила

Ион металла – медиатор электронного влияния



Вопрос 17. Активные центры ферментов и механизмы катализируемых реакций.

- I Катализ с активацией воды карбоксильными группами
 - Пепсин
 - Лизоцим
- II Катализ с активацией воды имидазольными группами гистидина
 - Папаин
 - Рибонуклеаза
- III Цинк, кобальт, никель – зависимые гидролазы
 - Карбоксипептидаза А
 - Органософатгидролаза
 - Ni-зависимая уреаза
 - Щелочная фосфатаза
- IV Магний, марганец – зависимые гидролазы
 - Пиррофосфатаза
 - Экзонуклеаза
 - ДНК-полимеразы

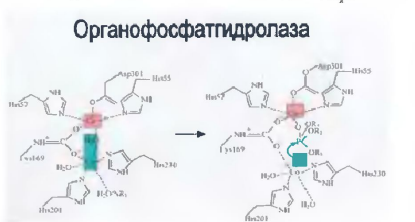
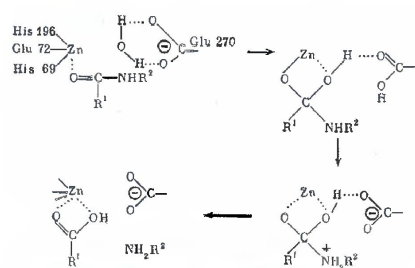


Вопрос 18. Основные мишени действия лекарственных препаратов.

Основные мишени лекарственных средств:

- Бактерии (антибактериальные химиотерапевтические средства – антибиотики)
- Ферменты (ингибиторы ферментов)
- Рецепторы, ионные каналы

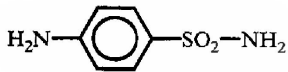
Карбоксипептидаза, как пример металлоактивных протеаз.



Бактериальная клетка

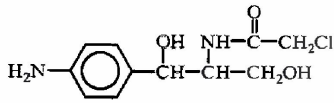
Нарушение синтеза клеточной стенки	Нарушение проницаемости цитоплазматической мембраны	Нарушение синтеза РНК	Нарушение синтеза белка на уровне рибосом
ПЕНИЦИЛЛИНЫ ЦЕФАЛОСПОРИНЫ ЦИКЛОСЕРИИ	ПОЛИМИКСИНЫ	РИФАМПИЦИН	ТЕТРАЦИКЛИНЫ ЛЕВОМИЦЕТИН МАКРОЛИДЫ АМИНОГЛИКОЗИДЫ

Сульфамидные препараты:



Левомецетин

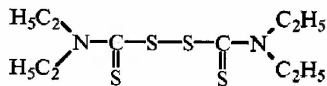
(хлорамфеникол, хлороцид, хлоронитрин)



Блокирует рибосомальный синтез белка, ингибирует фермент пептидилтрансферазу

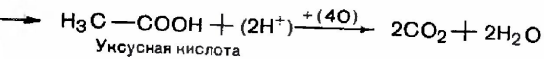
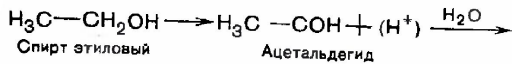
Вопрос 19. Лекарства на основе ферментов

Антабус (тетурам, дегоульфирам)



Ингибитор ацетальдегиддегидрогеназы

а) В обычных условиях



б) На фоне действия тетурама

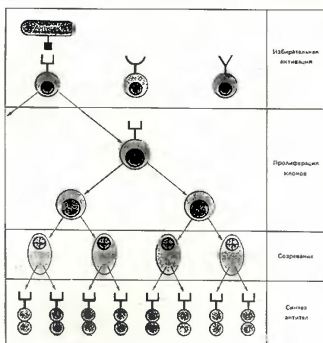
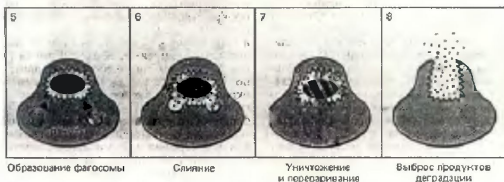


Вопрос 22. Специфический и неспецифический иммунитет.

"Профессиональные" фагоциты

нейтрофилы

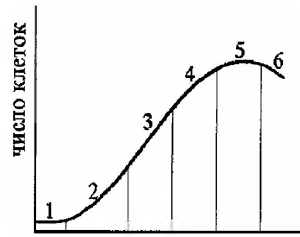
макрофаги



Вопрос 23. Основы культивирования клеток.

Фазы развития популяций в закрытой системе

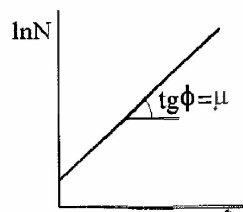
1. Индукционный период (лаг-фаза)
2. Экспоненциальный рост
3. Линейный рост
4. Замедление роста
5. Стационарная фаза
6. Фаза отмирания культуры (лизис)



$$\mu = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt}$$

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu(S, t) N(t)$$

μ - удельная скорость роста, размерность обратного времени (час⁻¹, сутки⁻¹)



Разностный метод

$$\ln N_i = \ln N_0 + \mu t_i$$

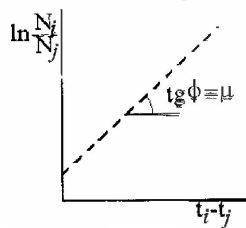
$$\ln N_j = \ln N_0 + \mu t_j$$

$$\ln \frac{N_i}{N_j} = \mu(t_i - t_j)$$

$$\mu(S) = \frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0}$$

уравнение Моно

S_0 - лимитирующий субстрат



Ограничения роста

«Контактное торможение»

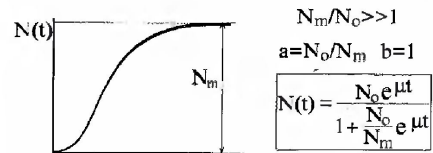
$$\frac{dN}{dt} = \mu N - \mu \frac{N^2}{N_m}$$

Уменьшение роста по мере увеличения плотности популяции

$$\frac{dN}{N(1 - \frac{N}{N_m})} = \mu dt$$

Интегрирование при $t=0, N=N_0$

$$\frac{N}{N_0} = \frac{b e^{\mu t}}{1 + a e^{\mu t}} \quad a = \frac{1}{N_m/N_0 - 1} \quad b = \frac{N_m/N_0}{N_m/N_0 - 1}$$



$N_m/N_0 >> 1$

$$a = N_0/N_m \quad b = 1$$

$$N(t) = \frac{N_0 e^{\mu t}}{1 + \frac{N_0}{N_m} e^{\mu t}}$$

$$\frac{dN}{dt} = \mu N - \mu \frac{N^2}{N_m}$$

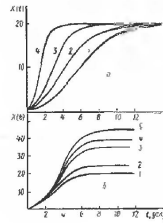
$$N(t) = \frac{N_0 e^{\mu t}}{1 + \frac{N_0}{N_m} e^{\mu t}}$$

$$t=0 \quad \frac{N_0}{N_m} \ll 1 \quad \frac{N_0}{N_m} e^{\mu t} \ll 1 \quad N(t) = N_0 e^{\mu t}$$

экспоненциальный рост

$$t \rightarrow \infty \quad \frac{N_0}{N_m} e^{\mu t} \gg 1 \quad N(t) = N_m = \text{const}$$

остановка роста



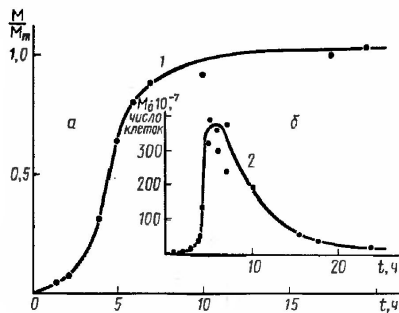
вариация μ при
постоянном $\frac{N_0}{N_m}$

вариация $\frac{N_m}{N_0}$ при
постоянном μ

Расход лимитирующего субстрата
Ингибирование продуктом

Появление субпопуляции, потерявшей способность к делению:
«прогрессирующая некомпетентность», «запрограммированный отказ»

E.coli



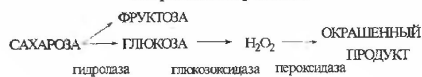
Вопрос 25. Основные направления инженерной энзимологии.

- Промышленные катализаторы на основе ферментов
- Белковый дизайн ферментов
- Тонкий органический синтез
- Иммуобилизованные ферменты и клетки
- Микроанализ
- Биоэлектрокатализ и биоэлектроника
- Ферменты как лекарственные средства
- Биокатализ в охране окружающей среды

Вопрос 26. Ферменты в аналитической химии

Методы детекции продуктов

- Электрхимические 10^{-5} М
- Амперометрические 10^{-6} М
- Флуориметрические 10^{-9} М
- Биолюминисцентные 10^{-12} М
- Сопряженные реакции



3. Пероксидаза



$$\eta_e \sim \frac{S_0}{E_0} \sim 10^6$$

иммуоферментный анализ

Вопрос 28. Биокатализ в тонком органическом синтезе.

- Ферменты в органических растворителях
- Ферментативная модификация β -лактамных антибиотиков
- Ферментативное разделение рацематов
- Синтез с использованием гидролаз
- Регенерация кофакторов
- Синтез аминокислот
- Синтез изотопомеченных соединений
- Синтез простаглиндов
- Модификация сахаров
- Синтез пептидных связей, направленная модификация белков

Созданы биокатализаторы следующих процессов

- Анаэробного получения этанола
- Получения лизина
- Получения уксусной кислоты
- Регенерации NAD и NADP
- Получения безлактозного молока (гидролиза лактозы)
- Синтеза простаглиндов и лейкотриенов
- Синтеза липоксенов
- Синтеза энантиомеров алкиламинфосфоновых и алкиламинфосфонистых кислот
- Синтеза β -лактамных антибиотиков
- Получения меченых нуклеозидфосфатов
- Синтеза циклодекстринов
- Синтеза ряда антиагрегационных агентов: аджоенов, пиридоксазолов
- Синтеза меченых фосфором 32,32 – нуклеозидфосфатов с помощью оригинальной системы отдельных биореакторов

