

ФЕРМЕНТЫ – БЕЛКИ С ОСОБОЙ ФУНКЦИЕЙ КАТАЛИЗА

2. Механизмы действия ферментов

3. Применение ферментов

Наталья Львовна Клячко

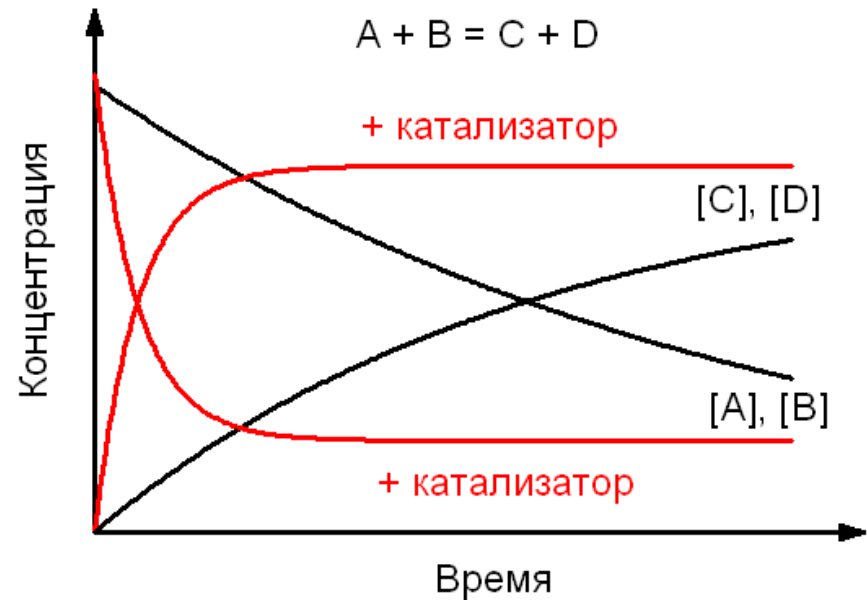
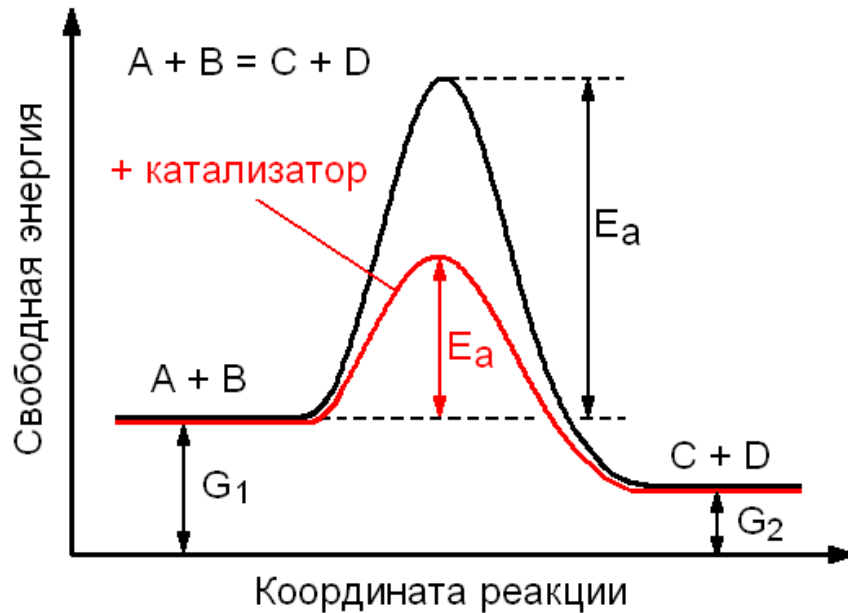
Профессор кафедры химической энзимологии
Химический факультет МГУ

klyachko@enzyme.chem.msu.ru

nklyachko@gmail.com

**В 4х следующих слайдах кратко
напоминание о материале прошлой лекции**

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ КАТАЛИЗА

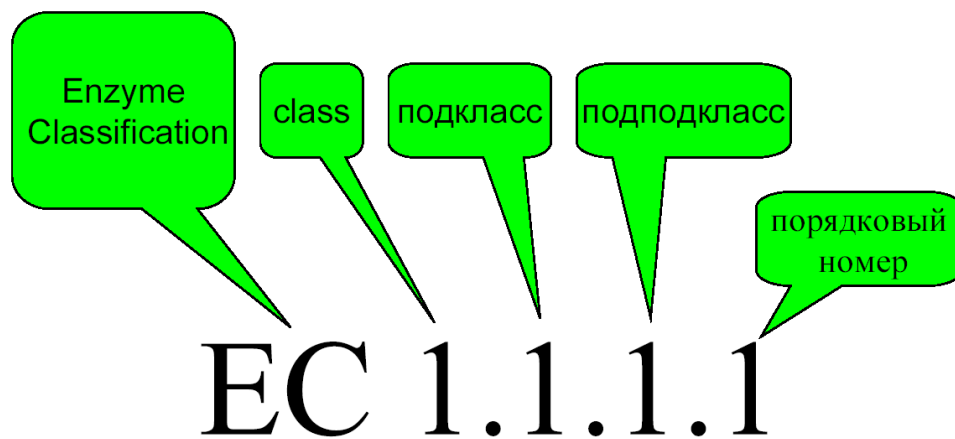


- Не всякая термодинамически выгодная химическая реакция будет идти (энергия активации, переходное состояние)
- Катализатор не влияет на константу равновесия (не изменяет $\Delta G = G_2 - G_1$)
- Катализатор понижает энергию активации

Факторы, определяющие каталитическую эффективность ферментов

- Сближение и ориентация (внутримолекулярный режим реакции)
- Напряжение и деформация; индуцированное соответствие
- Общий кислотно-основной катализ;
Ковалентный катализ
- Эффекты микросреды

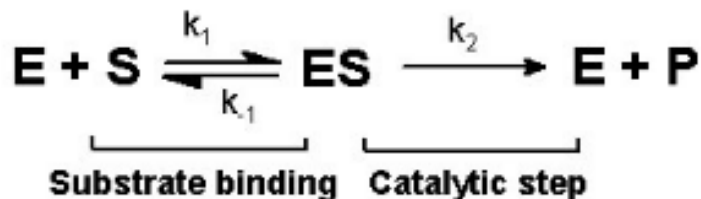
Классификация ферментов – Е.С. (Enzyme Classification)



1. Оксидоредуктазы
2. Трансферазы
3. Гидролазы
4. Лиазы
5. Изомеразы
6. Лигазы

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА

Уравнение Михаэлиса-Ментен



$$v = \frac{V_m S}{S + K_M}$$

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

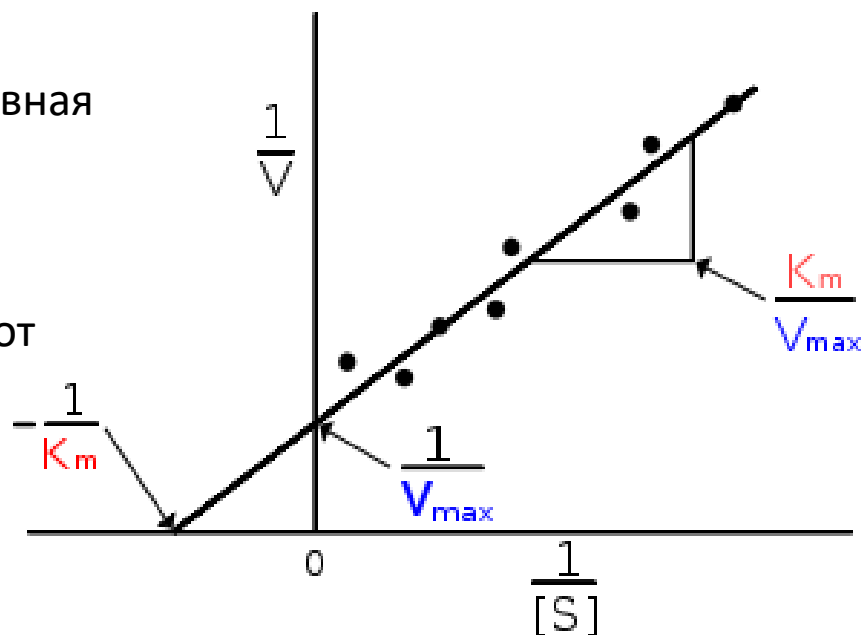
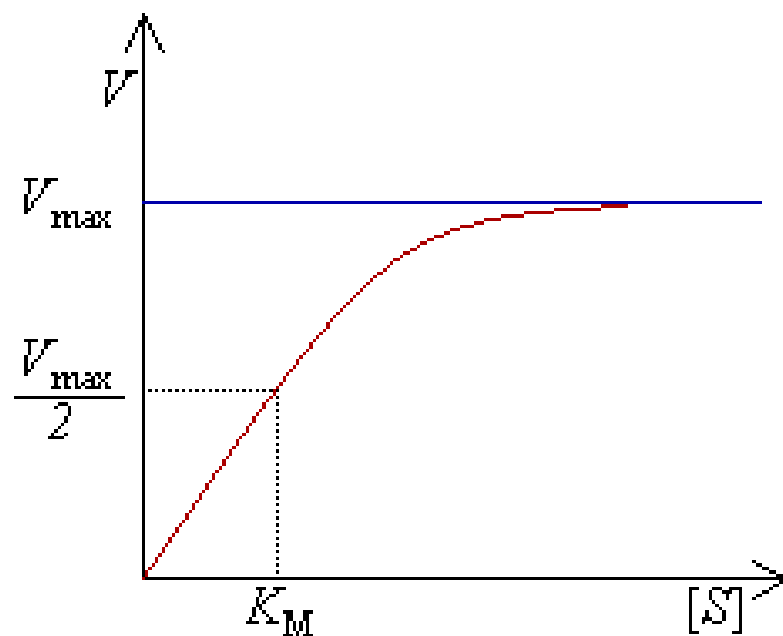
где

V_m — максимальная скорость реакции, равная

; $\quad k_{cat} E_0$

K_M — константа Михаэлиса, равная концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину от максимальной;

S — концентрация субстрата.



$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$

РЕГУЛЯЦИЯ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

- **ИНГИБИРОВАНИЕ, АКТИВАЦИЯ**
- **pH – ЗАВИСИМОСТИ**
- **ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ**

Ингибиторы обратимые

Конкурентные

Неконкурентные

Бесконкурентные

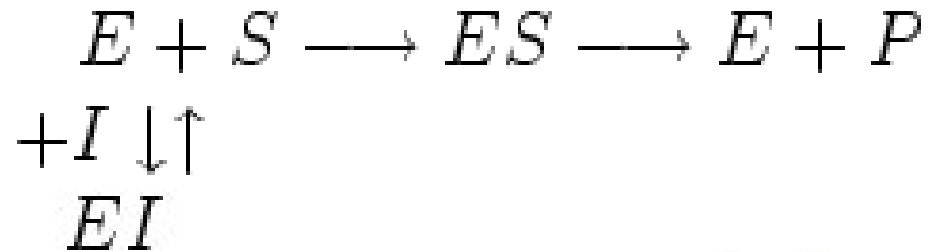
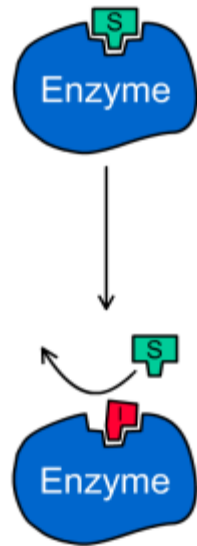
Ингибиторы необратимые

Модификаторы

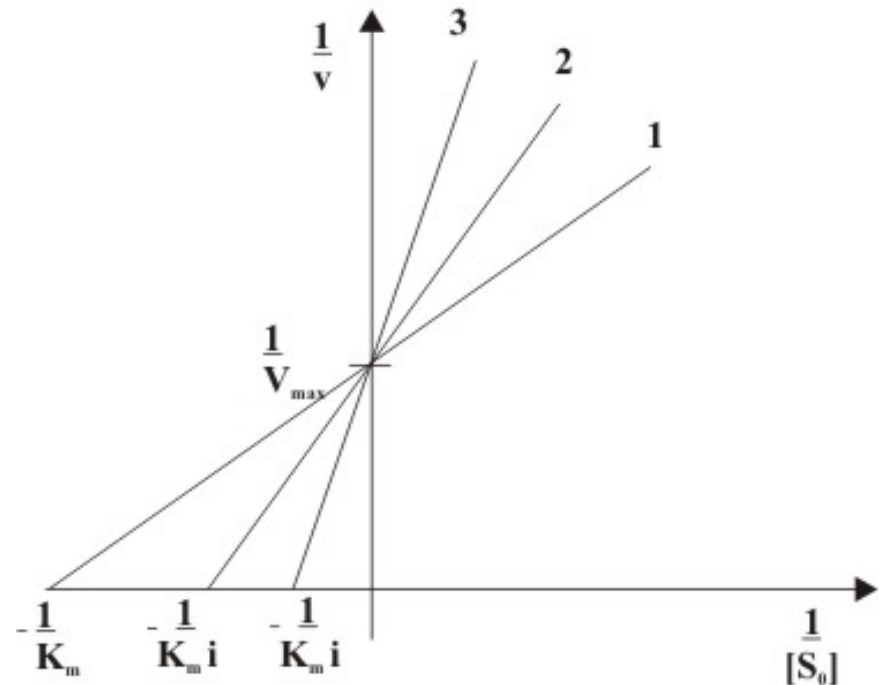
**Субстратоподобные
(суицидные)**

ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Обратимое конкурентное

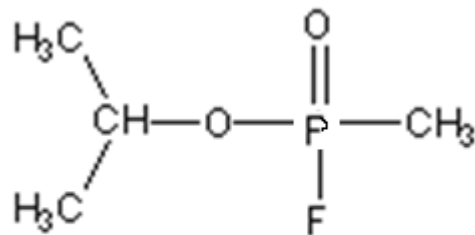
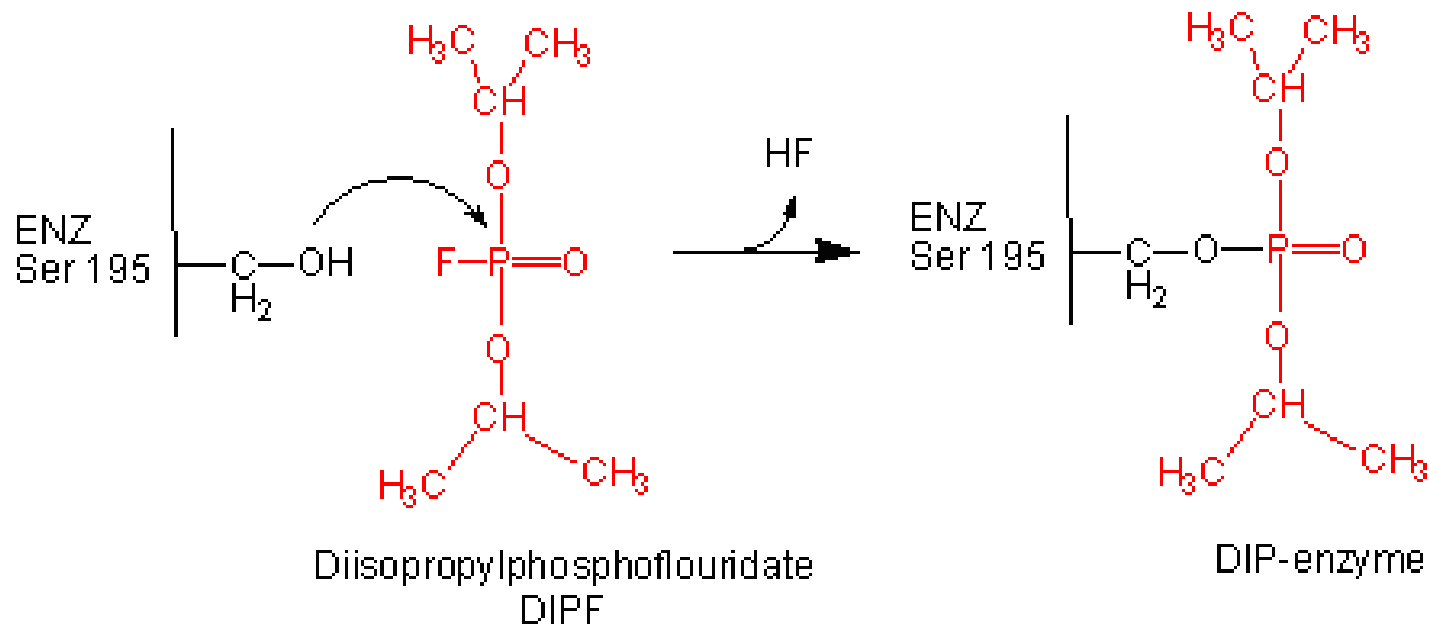


$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m(1 + \frac{[I]}{K_i})}$$



НЕОБРАТИМОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ СЕРИНОВЫХ ГИДРОЛАЗ

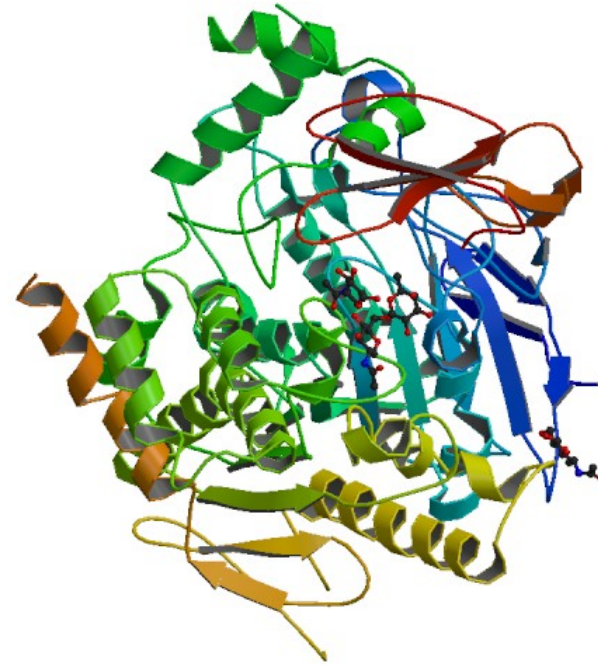
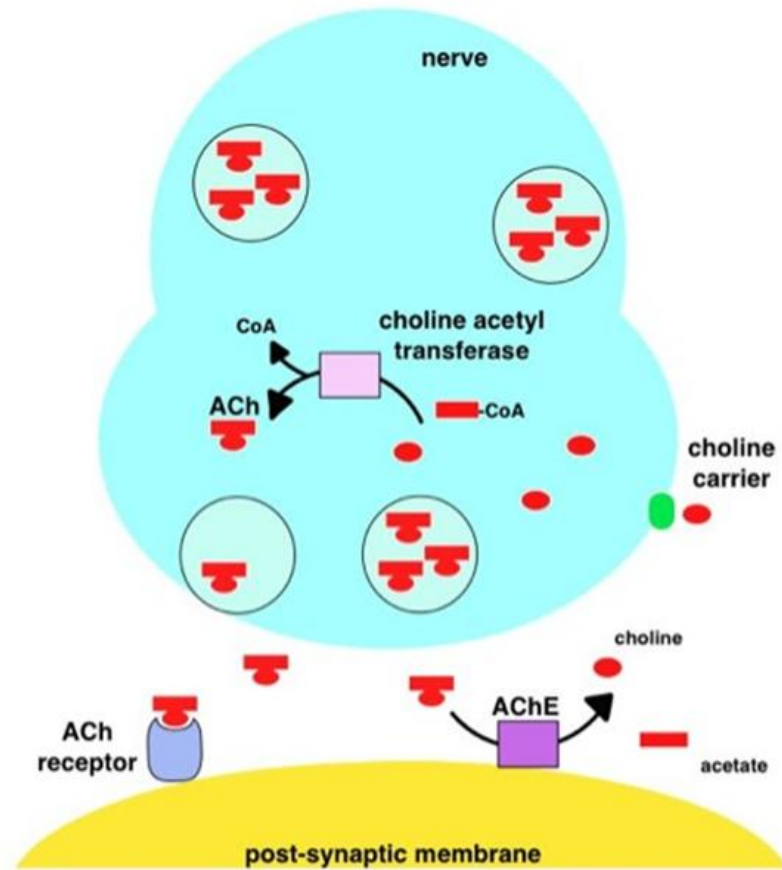
(Химотрипсин, холинэстеразы)



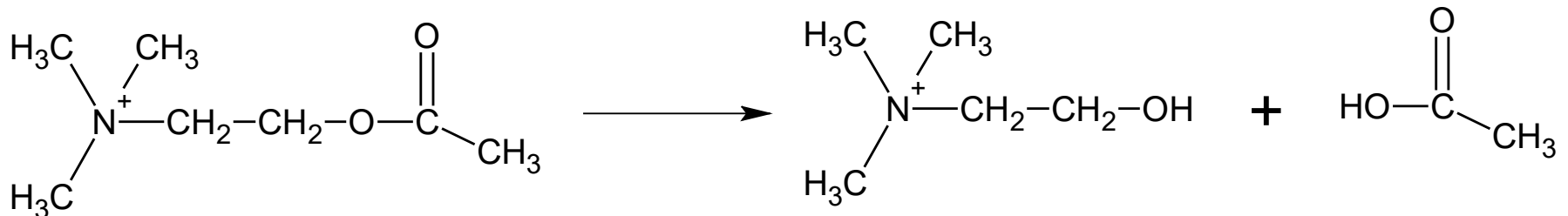
sarin

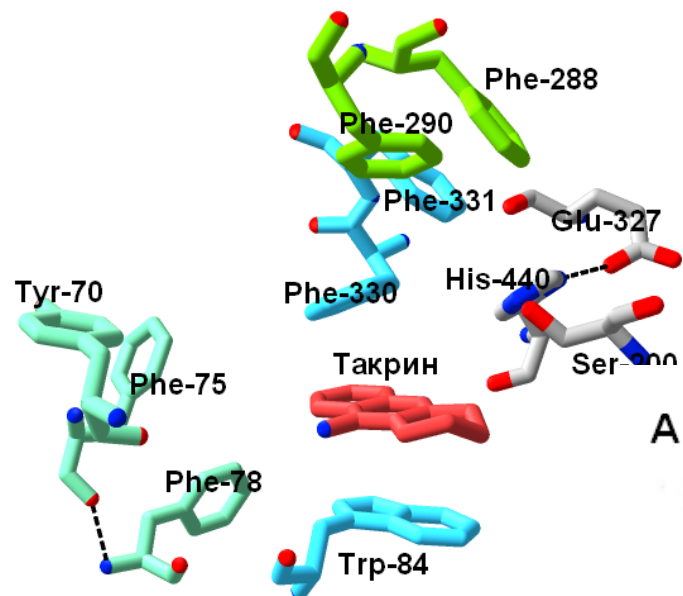
Органофосфатгидролаза перерабатывает
фосфорорганические соединения

Ацетилхолинэстераза

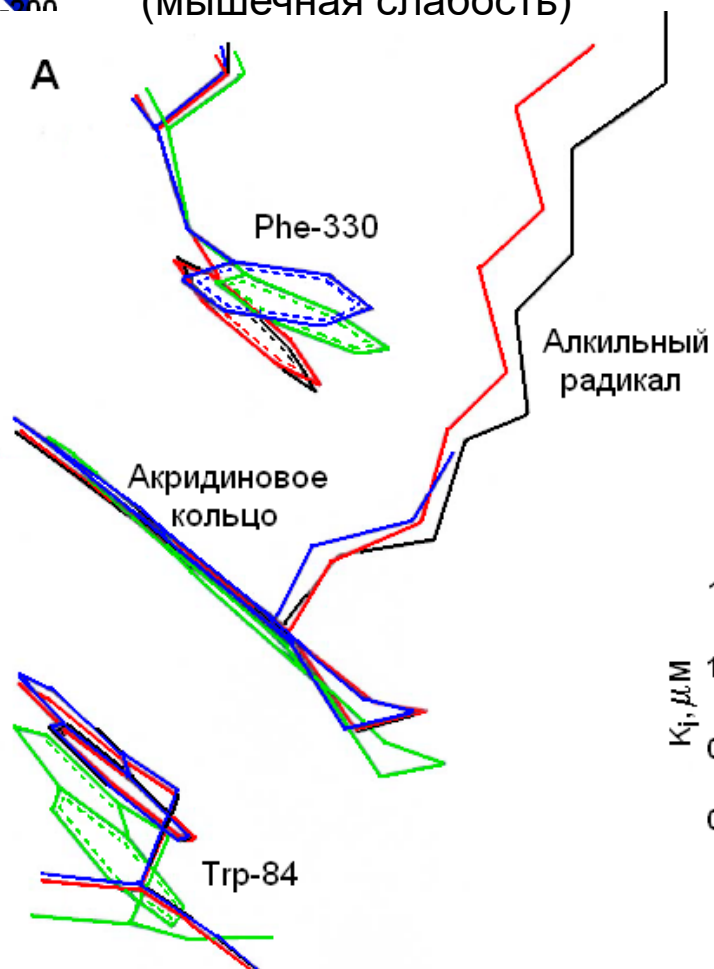


Фермент функционирует в холинэргических синапсах, обеспечивая циркуляцию нейромедиатора – ацетилхолина. $k_{\text{cat}} = 1.4 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$, $K_m = 9 \cdot 10^{-5} \text{ М}$

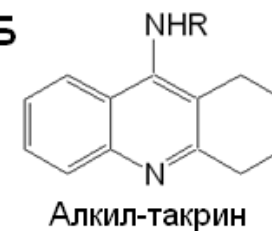




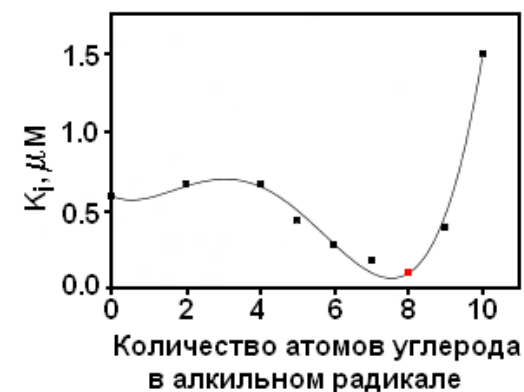
A



Б



В



ТАКРИН – обратимый конкурентный ингибитор ацетилхолинэстеразы

Физостигмин – необратимый ингибитор (терапия болезни Альцгеймера)

Пиридостигмина бромид – ингибитор в терапии аутоиммунного заболевания *Myasthenia gravis* (мышечная слабость)

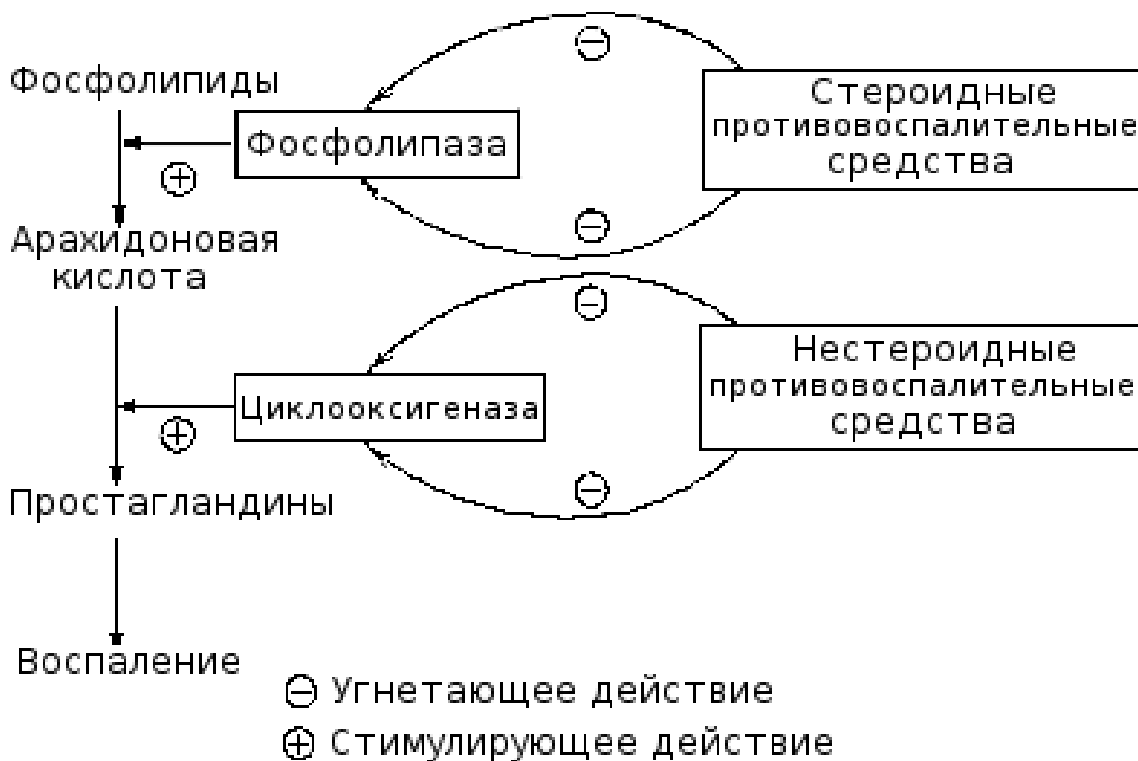
Боль — наиболее распространенный ведущий (основной) симптом многих заболеваний и патологических состояний.

Боль — полезный признак, сигнализирующий о неполадках со здоровьем. Однако боль, «перерастающая» в болевой синдром, часто уже нуждается в самостоятельном, отдельном лечении.

В механизме возникновения **болевого синдрома** ведущую роль играет повышение чувствительности свободных нервных окончаний (ноцицепторов) под воздействием веществ, которые в больших количествах начинают вырабатываться при повреждении клеток.

Ноцицэптор ([лат. nocens](#) «вредный» + [рецептор](#), также **ноцирецептор**) — первичный сенсорный нейрон, который активируется только болевым раздражителем (который повреждает или потенциально может повредить ткани организма). Интенсивная стимуляция ноцицепторов обычно вызывает неприятные [ощущения](#) и может причинить вред организму.

Медиаторы воспаления: это **гистамин, цитокины, простагландины** и пр. Наиболее значимы в возникновении боли **простагландины — вещества, которые на биохимическом уровне являются непосредственной причиной боли, расширения сосудов и появлении ощущения тепла.** Некоторые из них, например, **простагландин E2** повышает чувствительность **рецепторов боли.**

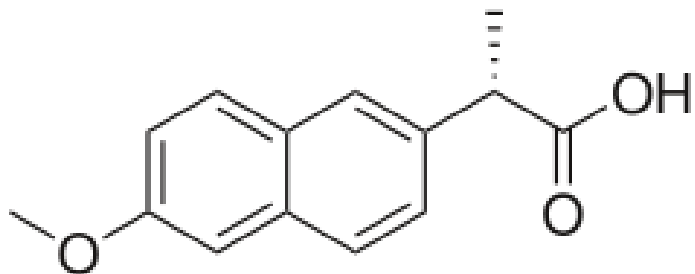


Стероидные препараты

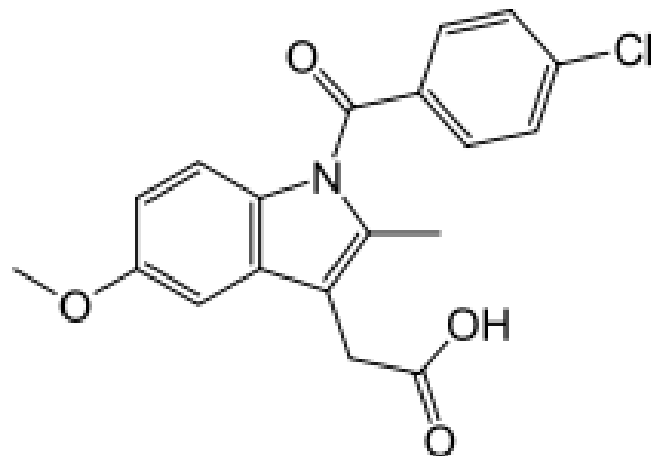
угнетают активность фермента **фосфолипазы** и за счет этого нарушают образование арахидоновой кислоты.

Нестероидные препараты

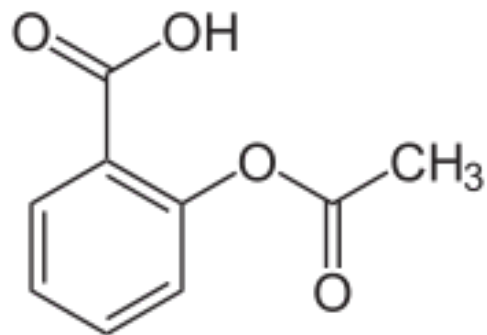
блокируют **циклооксигеназу**, с помощью которой из арахидоновой кислоты образуются простагландины. Таким образом, стероидные и нестероидные противовоспалительные средства **препятствуют образованию простагландинов на разных этапах их синтеза**



Напроксен



Индометацин

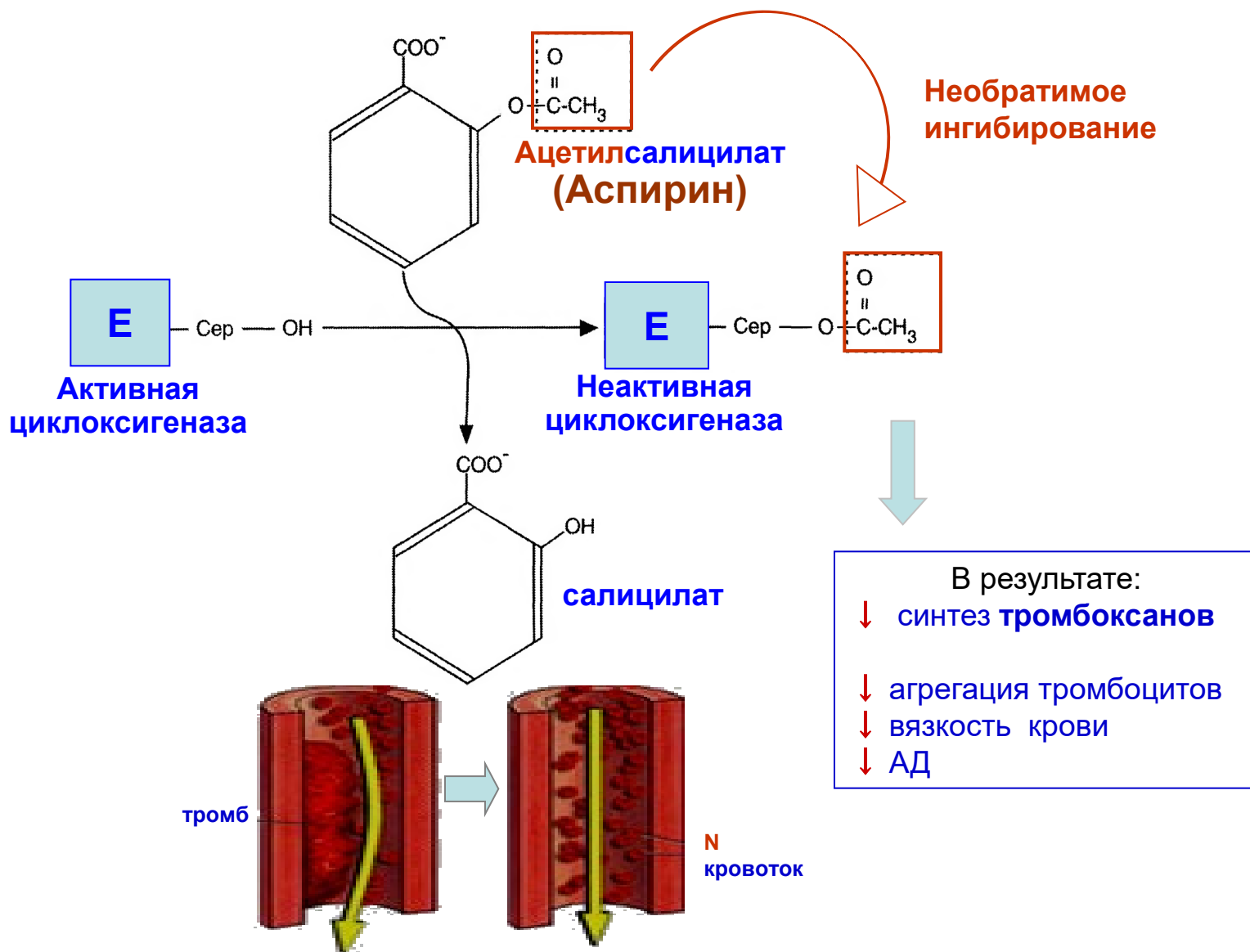


Ацетилсалициловая
кислота (аспирин)

**Нестероидные противовоспалительные
средства
ИНГИБИТОРЫ COX-1 и COX-2
Циклооксигеназы**

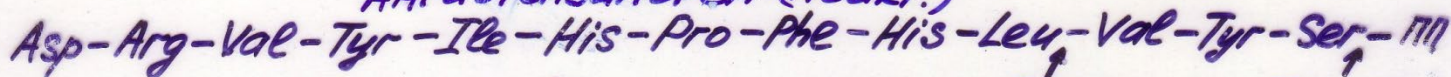


МЕХАНИЗМ ИНАКТИВАЦИИ ЦИКЛОКСИГЕНАЗЫ АСПИРИНОМ



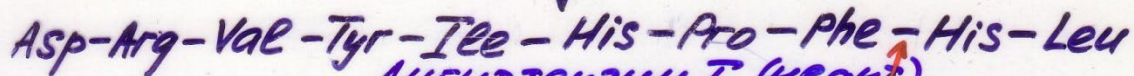
РЕГУЛЯЦИЯ КРОВОЯНОГО ДАВЛЕНИЯ

АНГИОТЕНЗИНОГЕН (неакт.)



↑
ренин

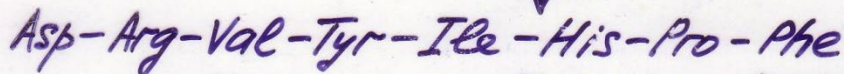
↑
трипсин



АНГИОТЕНЗИН I (неакт.)

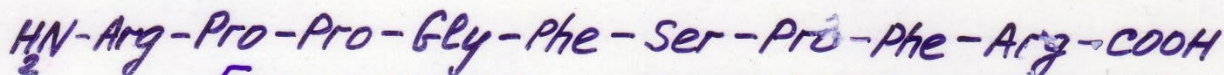
↑
АПФ

↓
АПФ



АНГИОТЕНЗИН II (акт.)

МОЩНЫЙ СТИМУЛЯТОР
КРОВ. ДАВЛЕНИЯ (ПОВЫШАЕТ)



БРАДИКИНИН

ПОНИЖАЕТ ДАВЛЕНИЕ

Ядовитая змея — южно-американская ямкоголовая
гадюка парализует жертву.

Яд ⇒ резкое понижение давления.

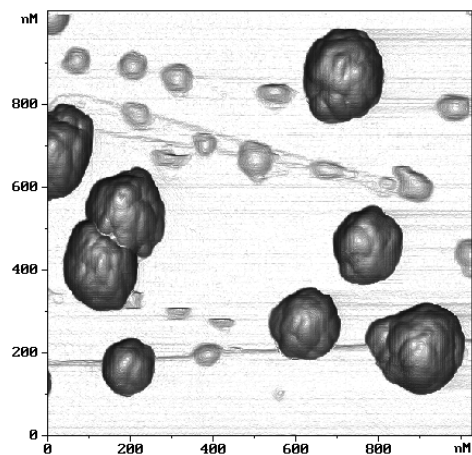
Выделяет особые пептиды, стимулирующие акт. бр.,
т.к. блокируют АПФ. и защищают бр. от инактив.

(АПФ обычно контрол. процесс,
инактивир. бр.).

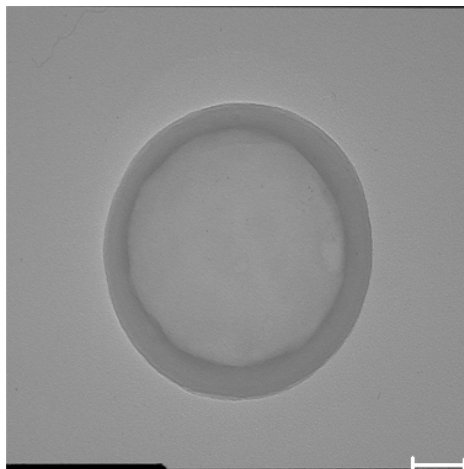


Синтезирован ряд пептидов, исп. в мед., напр.,
каптоприл. Он ингибирует АПФ ⇒ сниж. давл.

Кальций-фосфатные наночастицы для офтальмологии



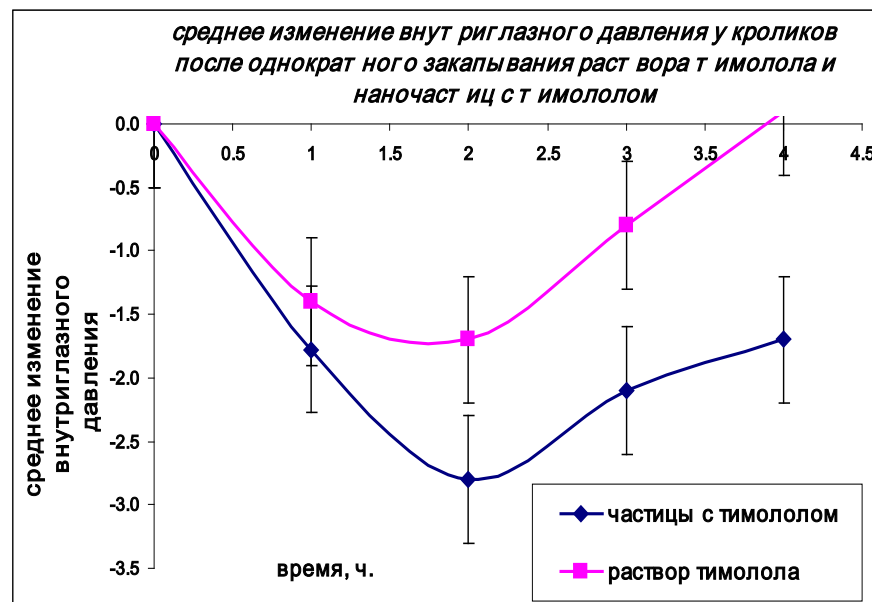
Атомно-силовая микроскопия



Проникающая электронная микроскопия



Кальций-фосфатные наночастицы – для офтальмологических лекарственных препаратов.
Полые сферы с размерами от **40** до **600 нм**, которые можно изменять.
Результаты тестирования наночастиц с коммерческим лекарственным препаратом малеатом тимолола на кроликах демонстрируют более **эффективное** и **продолжительное** действие тимолола в **наночастицах** по сравнению с водным раствором препарата.



РЕГУЛЯЦИЯ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

- ИНГИБИРОВАНИЕ, АКТИВАЦИЯ
- pH – ЗАВИСИМОСТИ
- ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

Ингибиторы обратимые

Конкурентные

Неконкурентные

Бесконкурентные

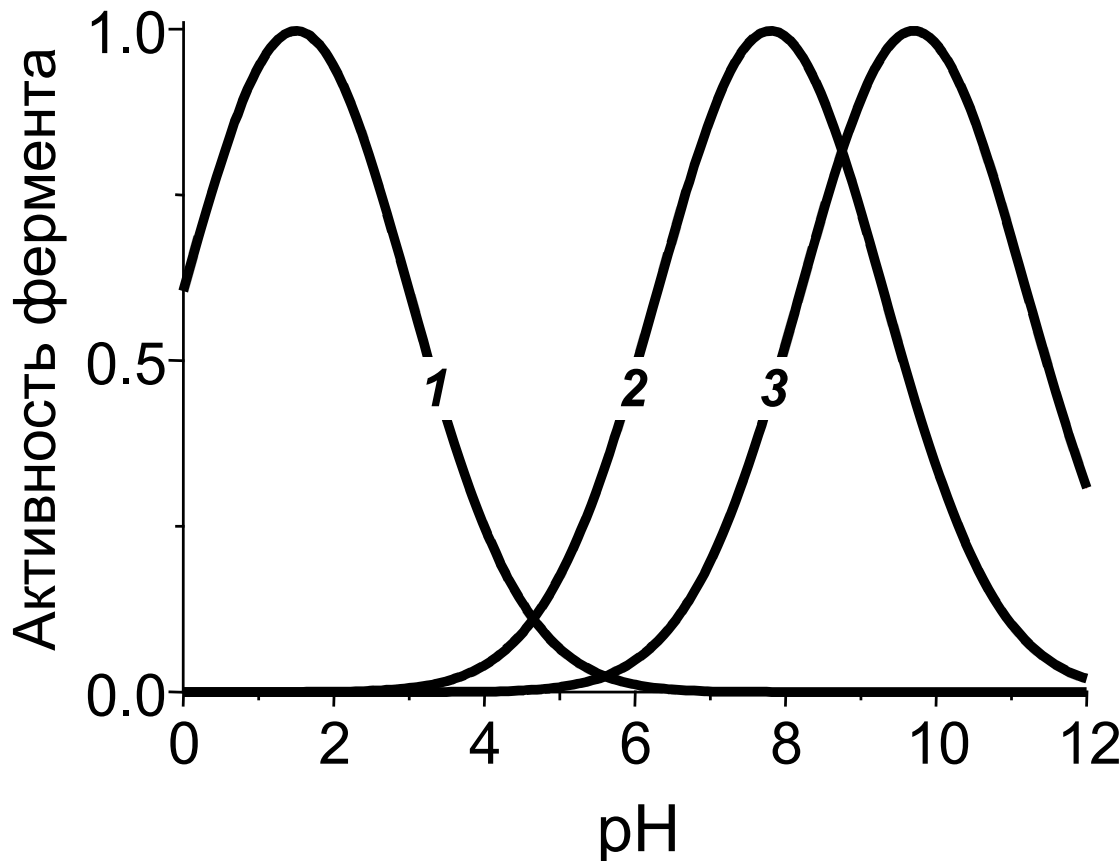
Ингибиторы необратимые

Модификаторы

Субстратоподобные
(суицидные)

Кинетика ферментативных реакций

Зависимость скорости ферментативных реакций от pH



Зависимость активности ферментов (для удобства сравнения приведены активности, нормированные к единице) от pH.

1 — Пепсин,
2 — рибонуклеаза,
3 — аргиназа

Нобелевская премия 2016 (физиология и медицина)

Ёсинори Осуми Yoshinori Ohsumi "for his discoveries of mechanisms for autophagy"

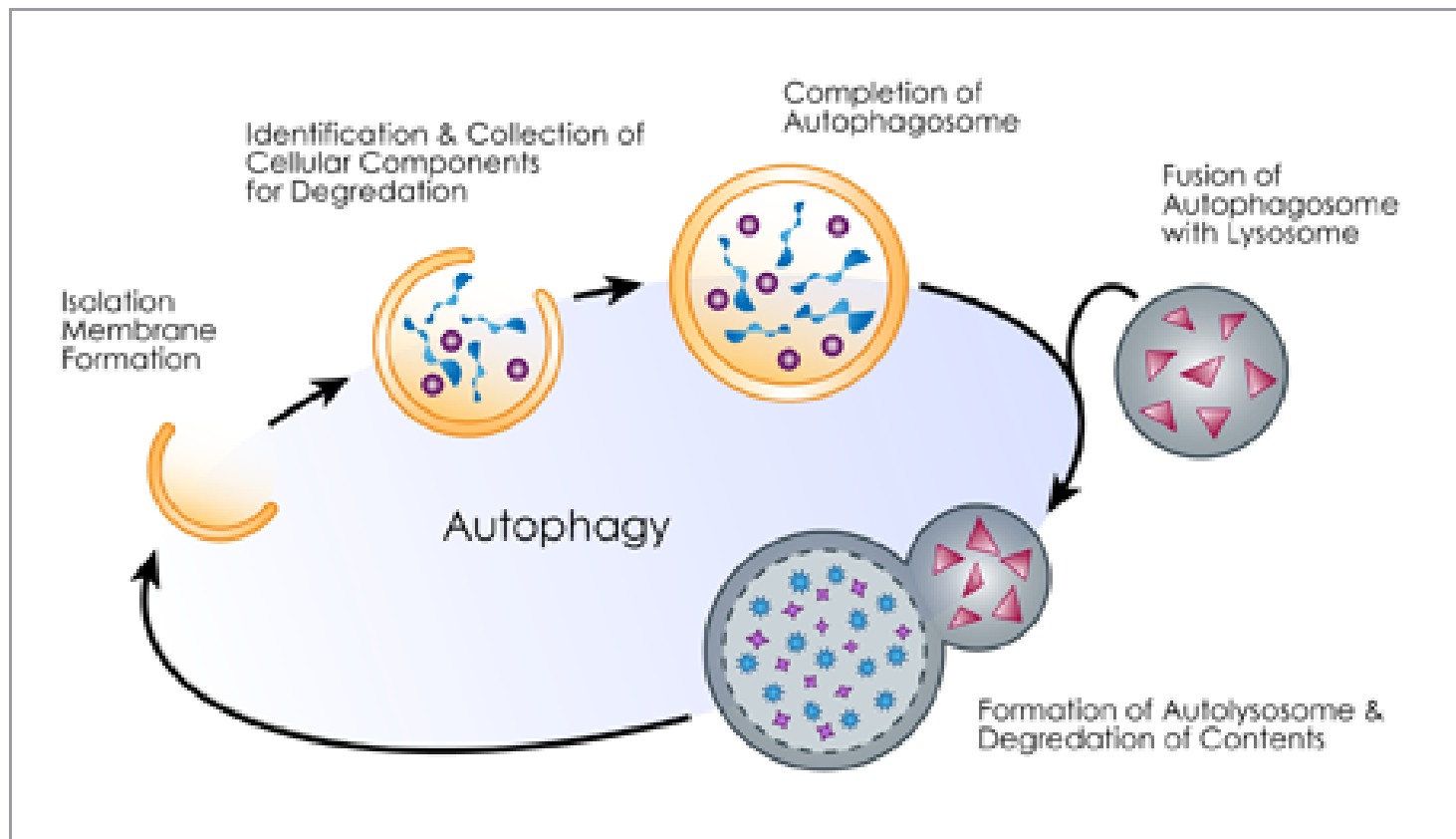
Макроавтофагия – основной путь для уничтожения поврежденных клеточных органелл и ненужных белков.

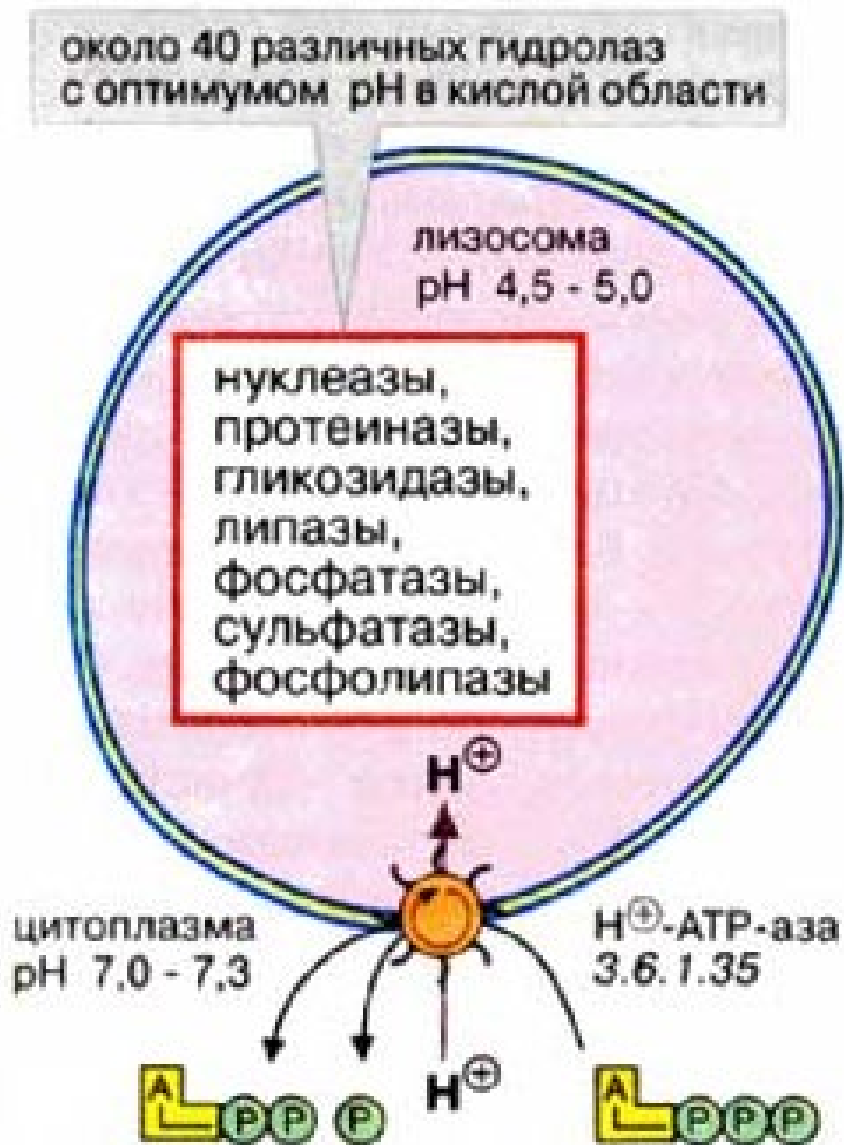
Образование двойной мембраны – автофагосомы вокруг органеллы.

Движение автофагосомы в цитоплазме клетки к лизосоме.

Слияние с лизосомой.

Лизосомальные ферменты в кислом pH деградируют содержимое автофагосомы.





Лизосомы — это органеллы диаметром 0,2-2,0 мкм, окруженные простой мембраной, способные принимать самые разные формы.

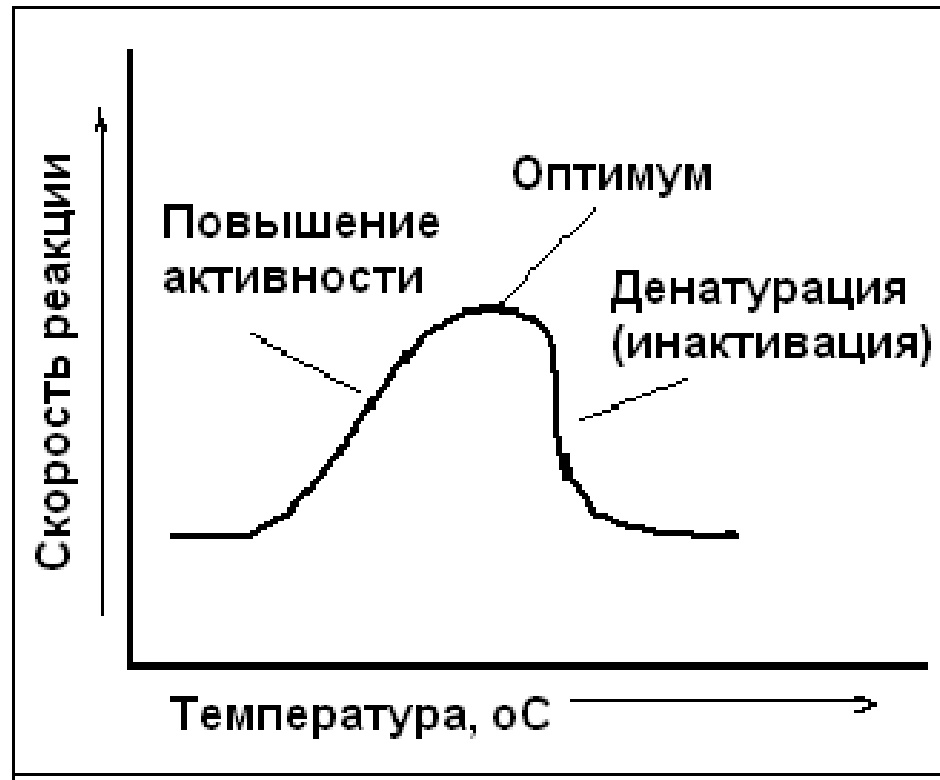
Несколько сотен лизосом на клетку.

Функция - деградация клеточных компонентов.

Около **40 типов различных расщепляющих ферментов** — **гидролаз с оптимумом действия в кислой области** (низкая активность при нейтральных pH — защита клеток от самопереваривания, если лизосомный фермент попадает в цитоплазму). Главный фермент лизосом — *кислая фосфатаза*.

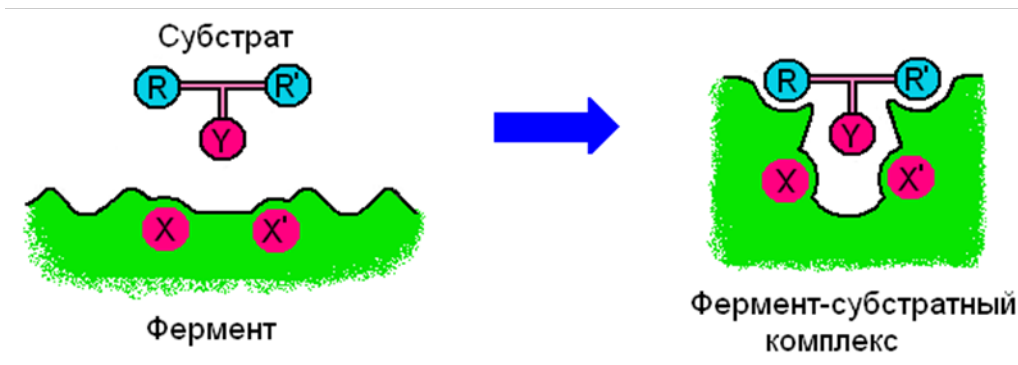
АТФ-зависимые протонные насосы в мембране обогащают лизосомы протонами, pH 4,5-5,0 (в то время как в цитоплазме pH 7,0-7,3).

ТЕМПЕРАТУРА ВЛИЯЕТ НА РАБОТУ ФЕРМЕНТА

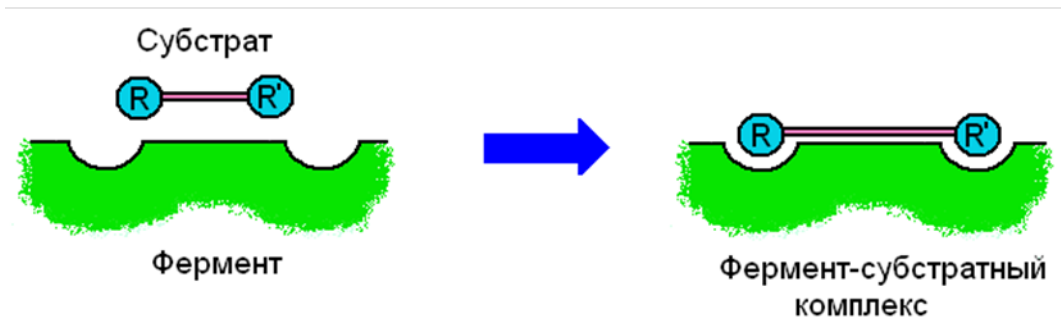




Ключ – замок
(Фишер)

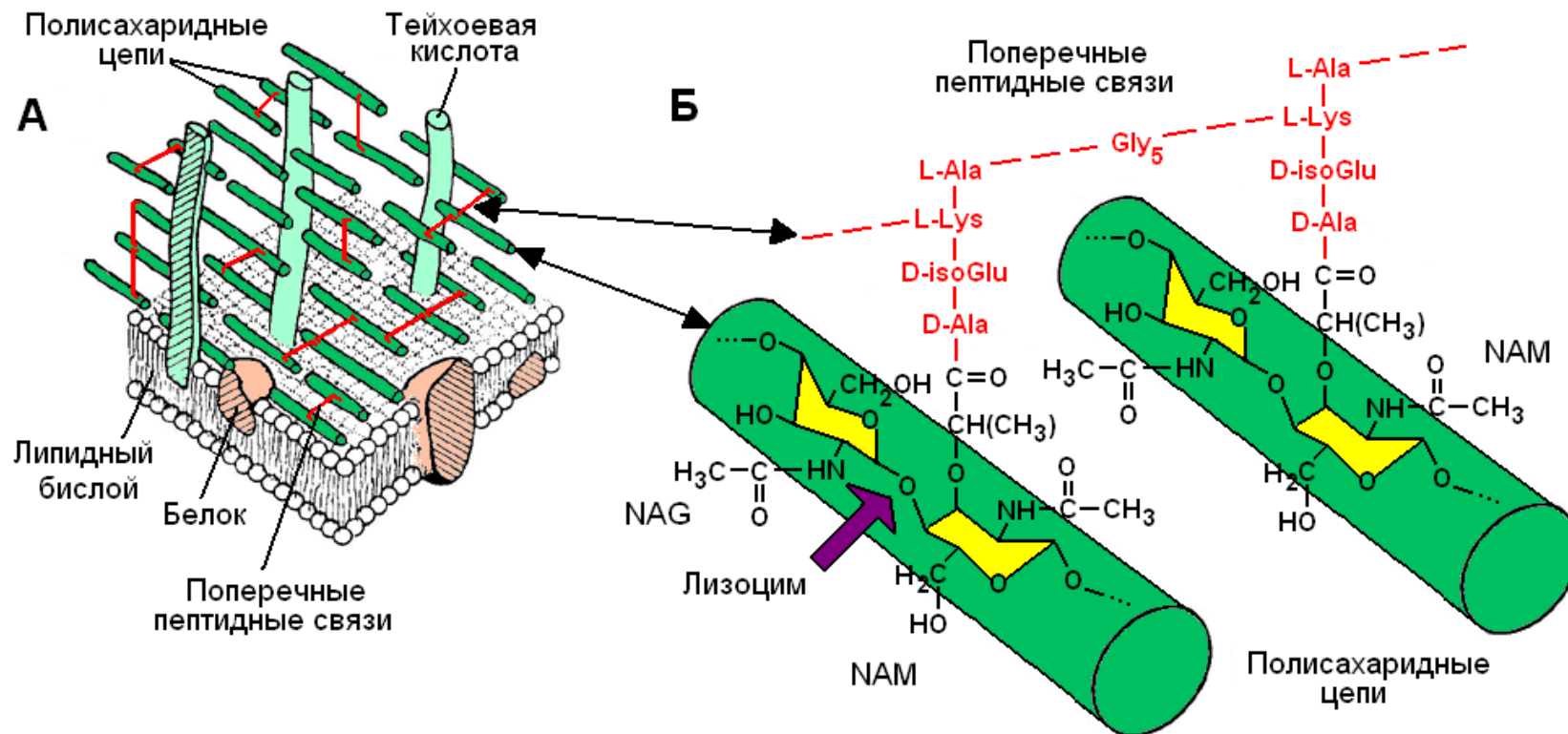


Механизм
индуцированного
соответствия
(Кошланд)

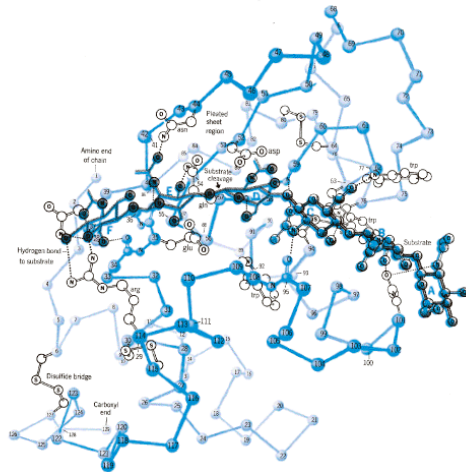


Механизм
напряжения
(«дыбы»)
(Ламри и Эйринг,
Дженкс)

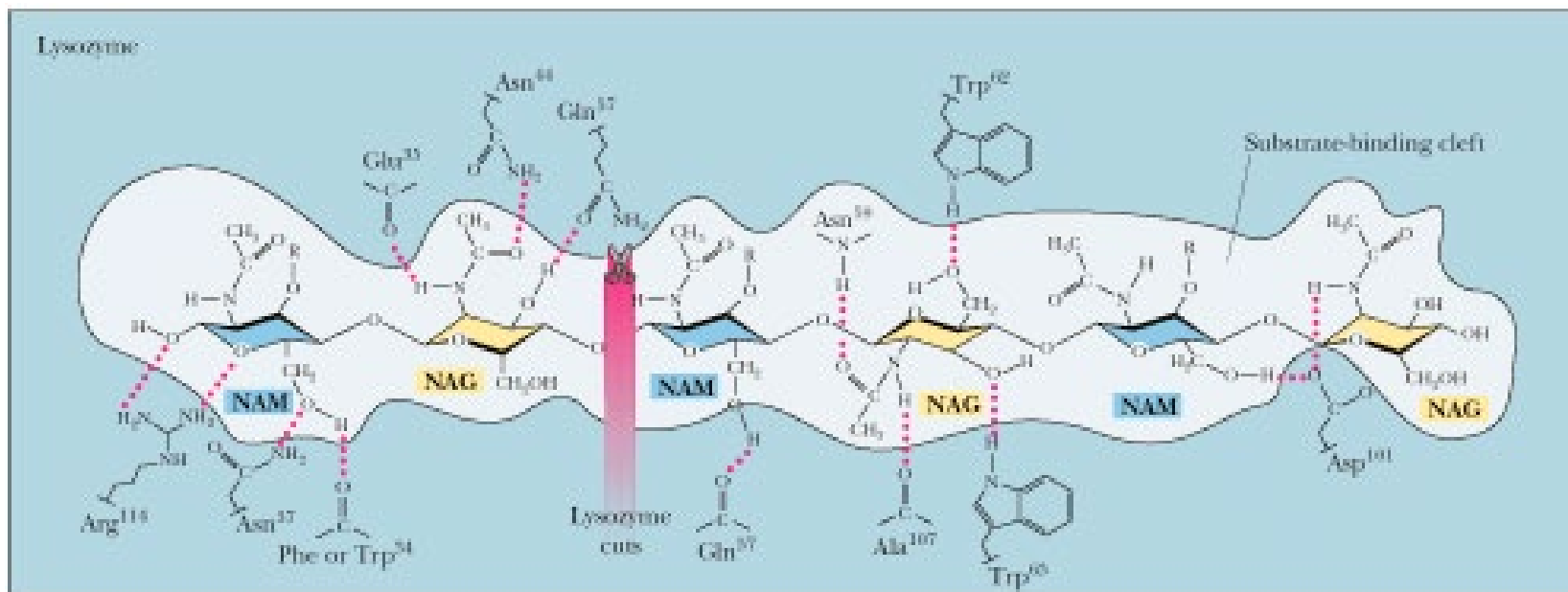
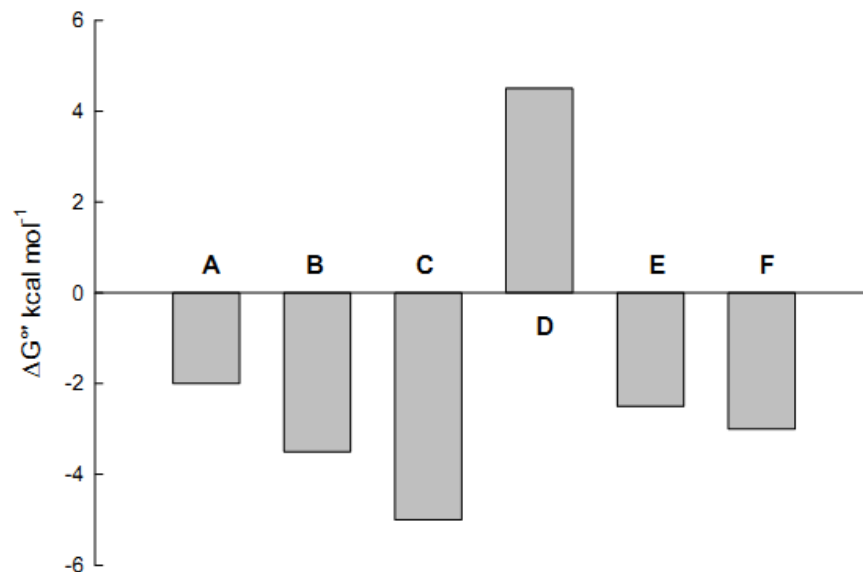
ЛИЗОЦИМ БЕЛКА КУРИНОГО ЯЙЦА – ГИДРОЛИЗ ПОЛИСАХАРИДНОГО ОСТОВА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ БАКТЕРИЙ



Случайно открыт Флемингом

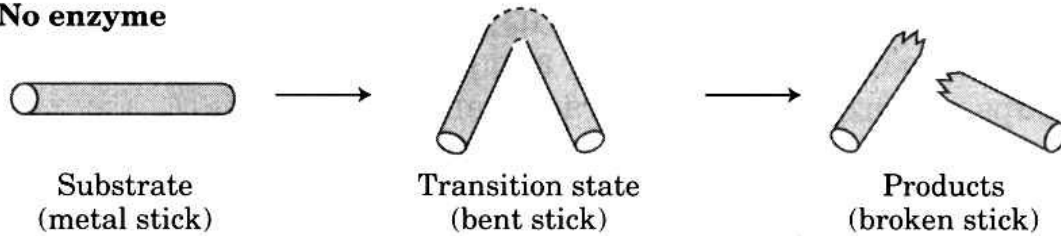


ЛИЗОЦИМ: многоточечное взаимодействие субстрата и фермента



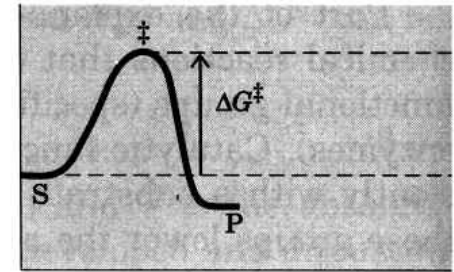
Предпочтительно связывание в переходном состоянии?

No enzyme

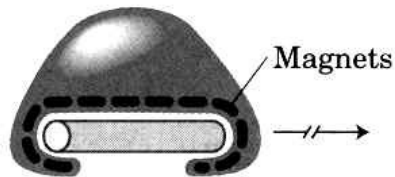


(a)

Free energy, G

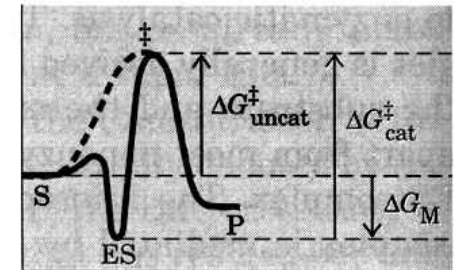


Enzyme complementary to substrate

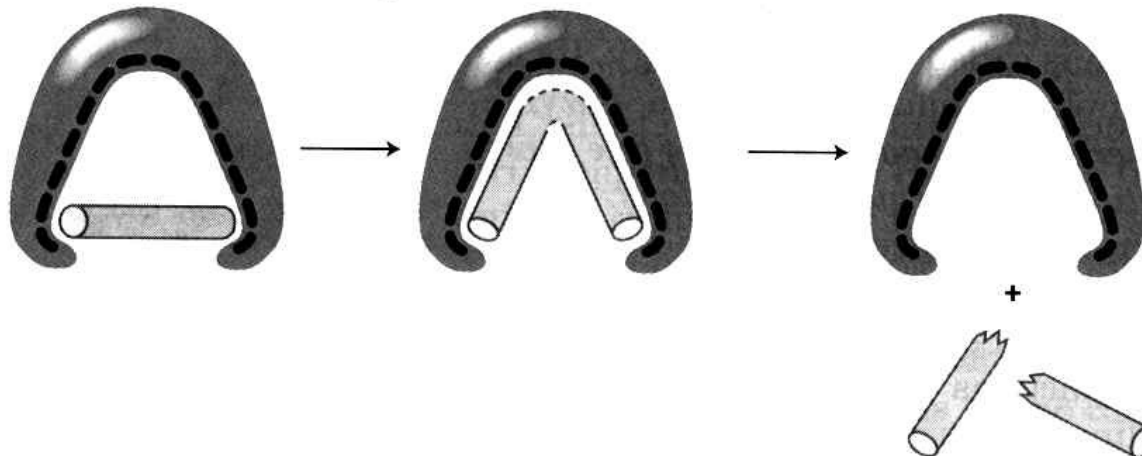


(b)

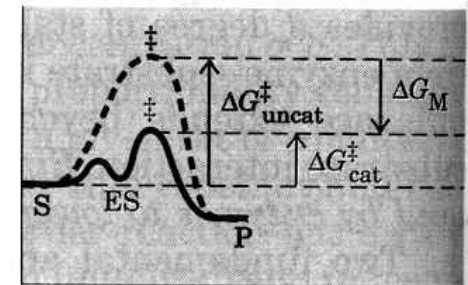
Free energy, G



Enzyme complementary to transition state

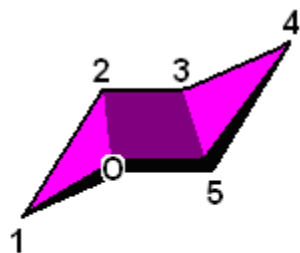


Free energy, G

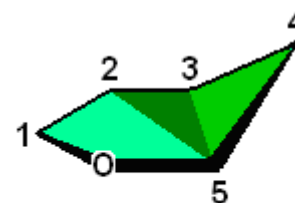


Reaction coordinate

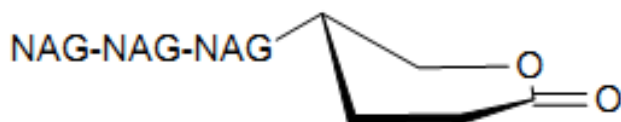
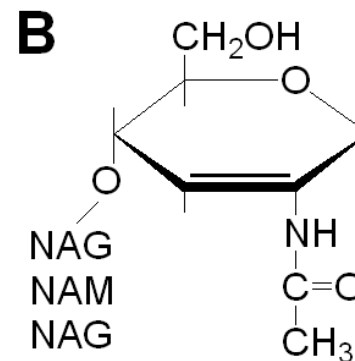
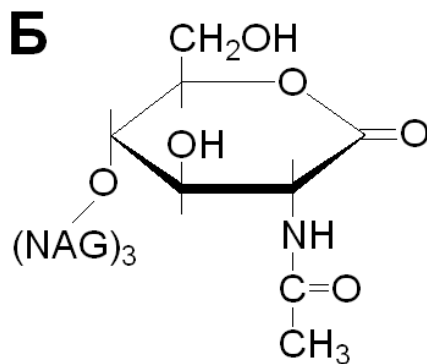
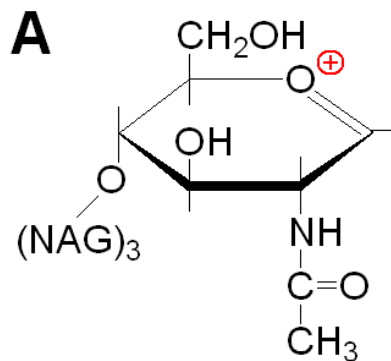
АНАЛОГИ ПЕРЕХОДНОГО СОСТОЯНИЯ СВЯЗЫВАЮТСЯ С ФЕРМЕНТОМ ЛУЧШЕ



Конформация
кресла



Конформация
полукресла



Связывается в 3600 раз лучше
в активном центре, чем NAG4

Факторы, определяющие каталитическую эффективность ферментов

- Сближение и ориентация
- Напряжение и деформация; индуцированное соответствие
- Общий кислотно-основной катализ
- Ковалентный катализ
- Эффекты микросреды

Ферменты могут быть выделены из любого живого организма. Диапазон источников коммерческих ферментов широк (from *Actinoplanes* to *Zymomonas*, from spinach to snake venom).

Из более 100 используемых ферментов более половины – из грибов и дрожжей, более трети – из бактерий (with the remainder divided between animal (8%) and plant (4%) sources).

Микробы предпочтительнее, чем растения и животные, т.к.:

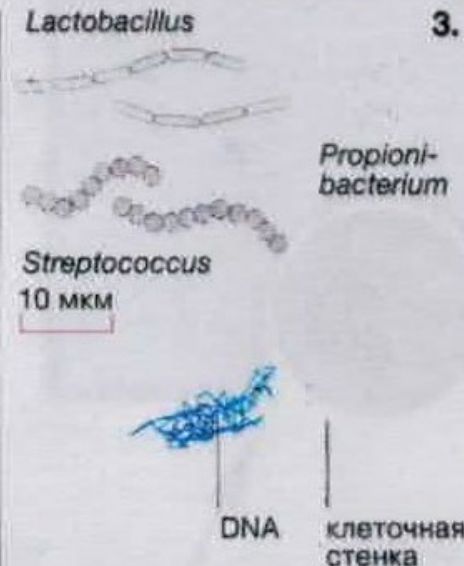
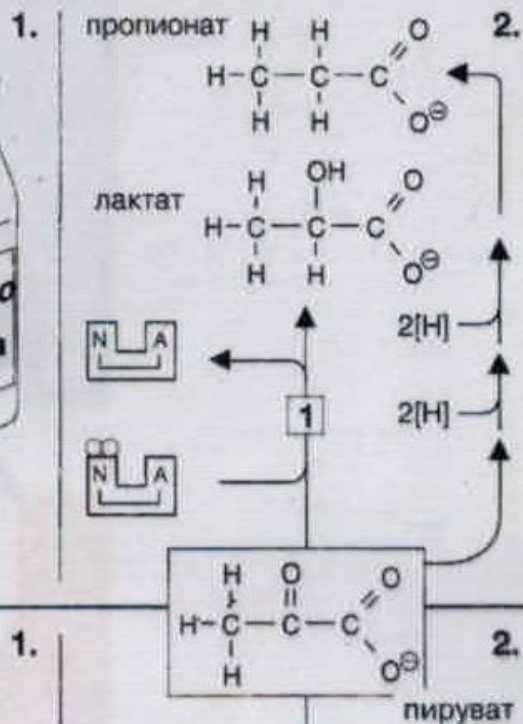
1. Дешевле производить;
2. Состав более предсказуемый и контролируемый;
3. Легче организовать поставщиков сырья постоянного состава;
4. Растительные и животные ткани содержат больше потенциально вредных материалов, чем микробы, включая фенольные соединения (из растений), эндогенные ингибиторы ферментов и протеазы.

Инженерная энзимология

- **Тонкий органический синтез (фармацевтическое производство)**
- **Ферменты в пищевой промышленности**
 - пищевые добавки
 - производство продуктов питания
 - кормовые добавки
- **Ферменты в медицине**
 - Лекарственные препараты на основе ферментов
 - диагностические наборы и устройства
- **Аналитические системы и устройства. Биосенсоры.**
- **Ферменты в бытовой химии, в стиральных и моющих средствах**
- **Ферменты в конверсии вещества и энергии**
- **Мониторинг окружающей среды и биоремедиация**



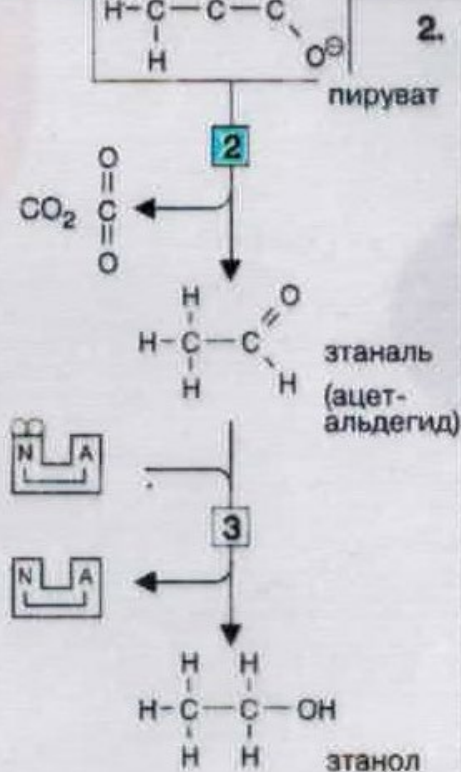
А. Молочнокислое и пропионовокислое брожение



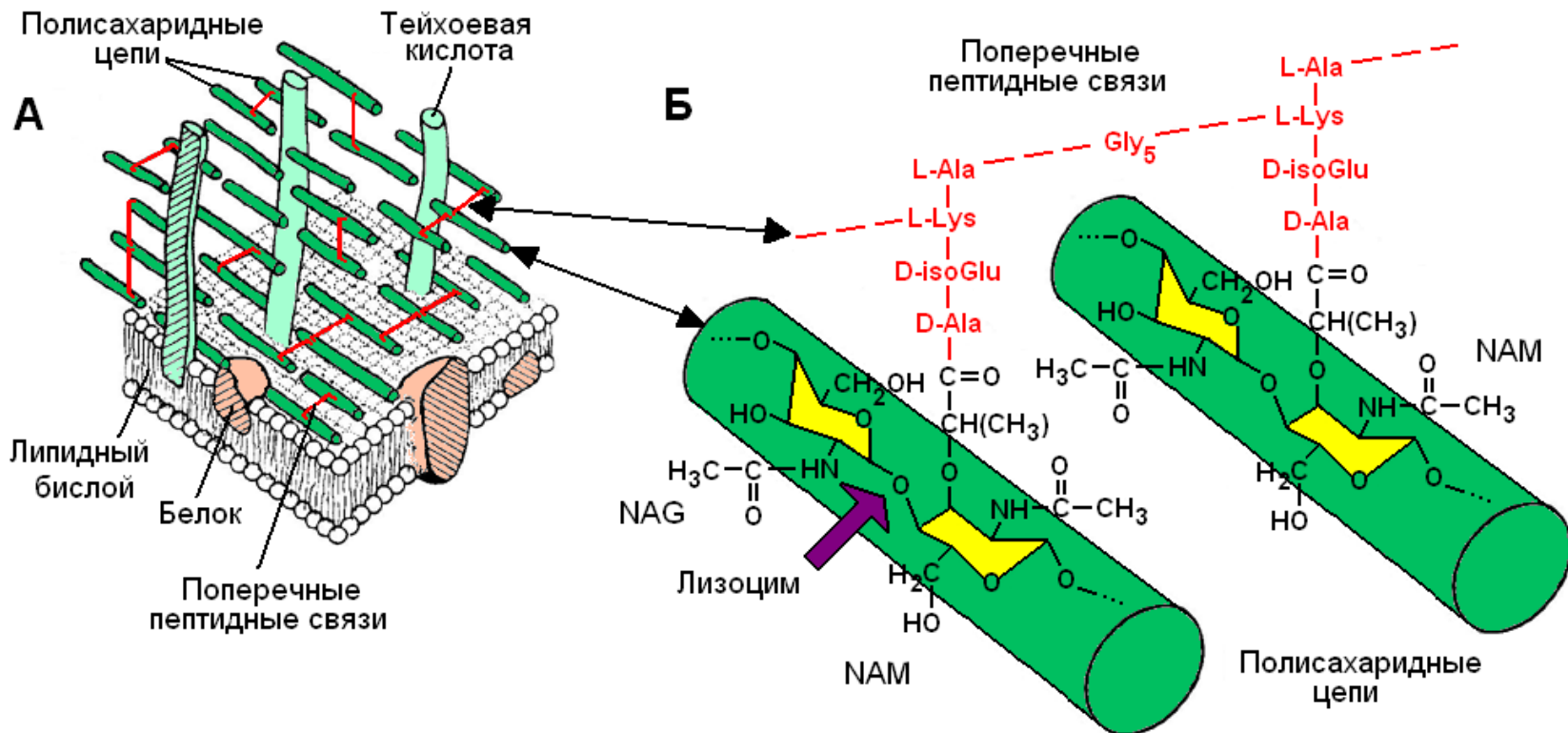
1. лактатдегидрогеназа
1.1.1.27
2. пируватдекарбоксилаза
[TPP] 4.1.1.1
3. алкогольдегидрогеназа
[Zn²⁺] 1.1.1.1



Б. Спиртовое брожение



КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА БАКТЕРИЙ

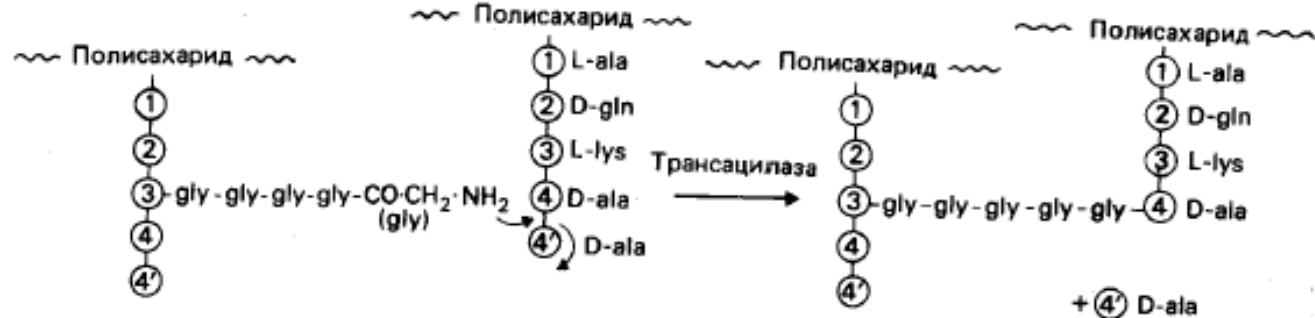


Флеминг (1928) открыл химиотерапевтическую активность пенициллина (роль в борьбе с инфекцией во время второй мировой войны).

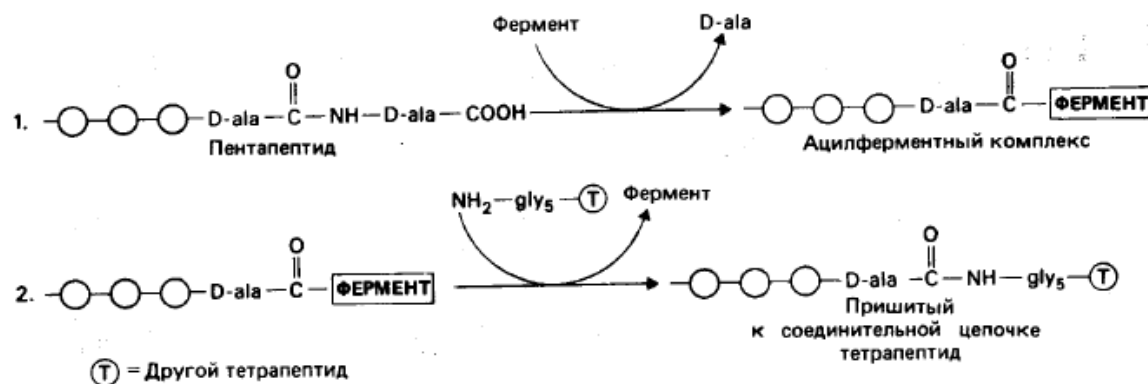
В 1945 году Флемингу, Флори и Чейну была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине «за открытие пенициллина и его целебного воздействия при различных инфекционных болезнях».

Антибиотики нарушают один из метаболических путей (процессов) в жизни бактериальной клетки.

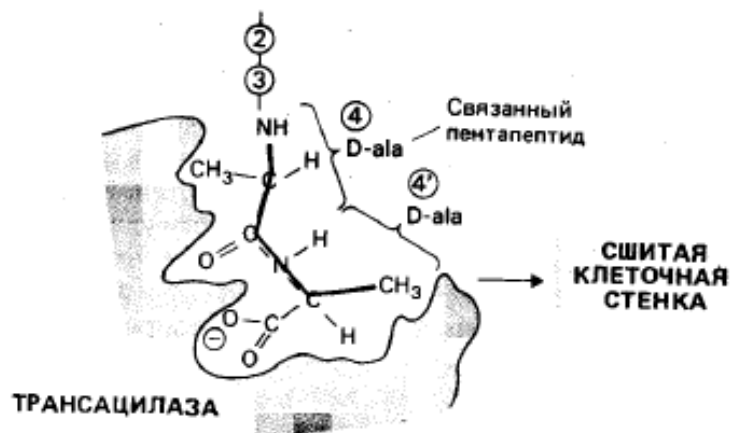
Пенициллины, в частности, нарушают процесс образования клеточной стенки бактерий.



Образование швов в клеточной стенке бактерии



Трансацилаза в отсутствие пенициллина

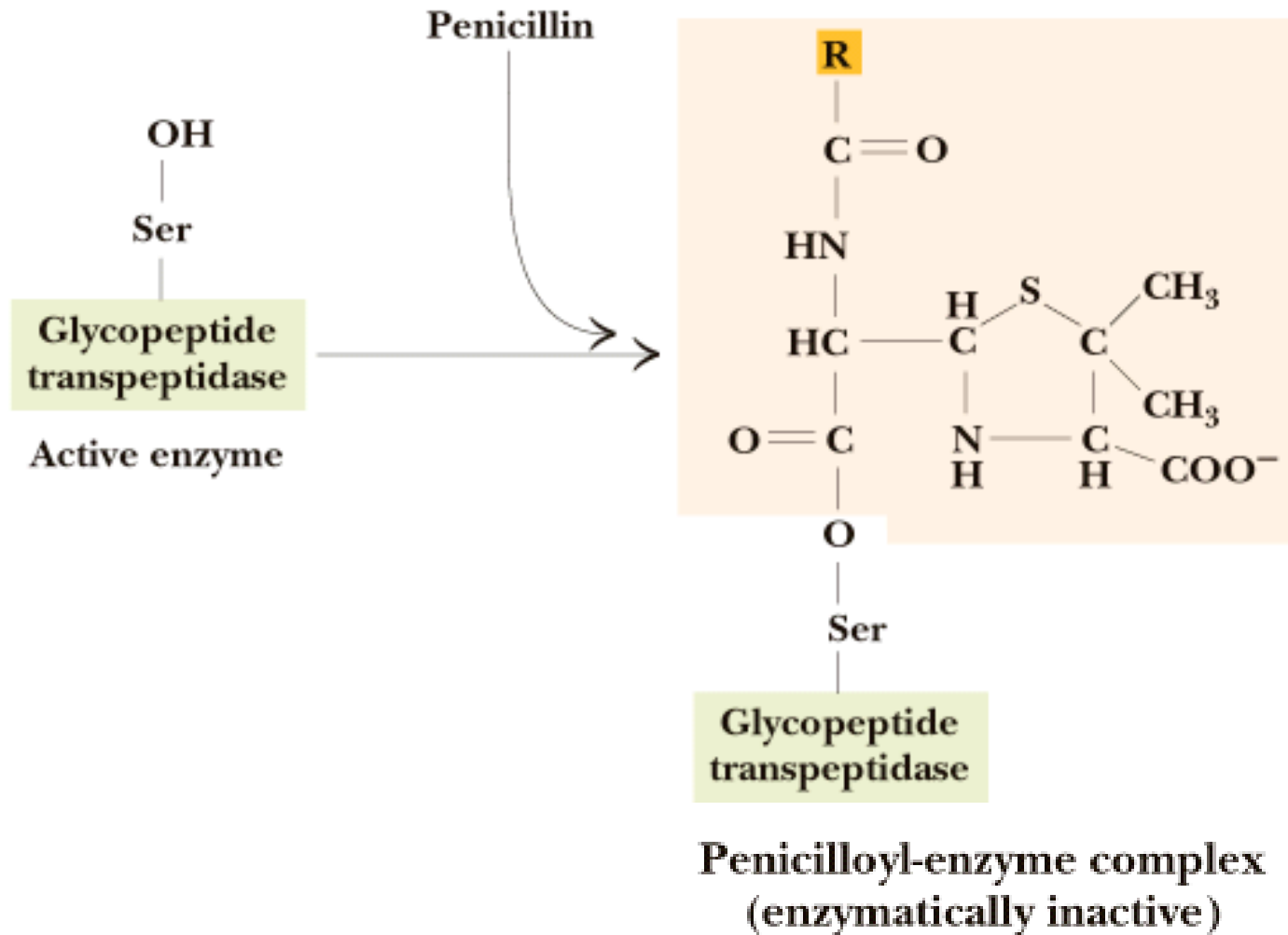


Трансацилаза в присутствии пенициллина



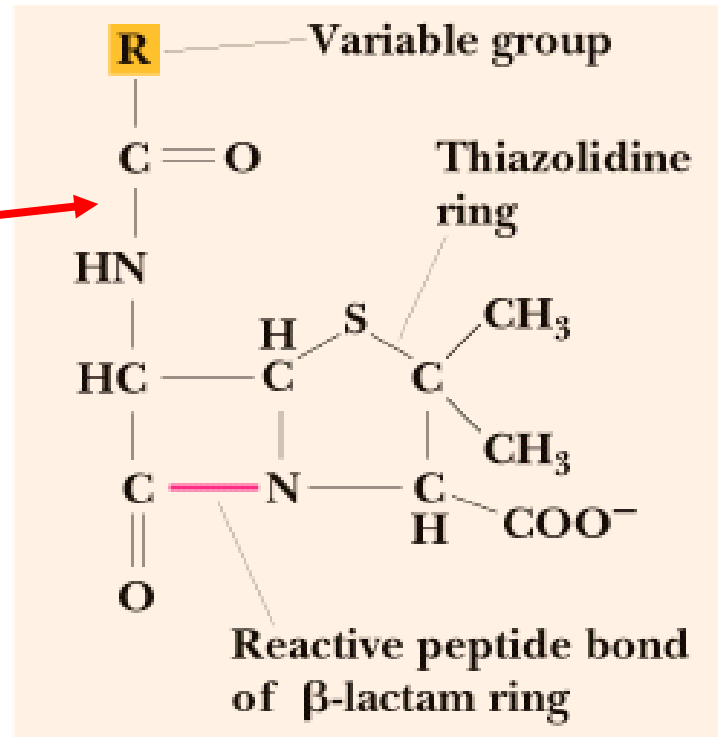
ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЕЙСТВИЯ ПЕНИЦИЛЛИНА

ПЕНИЦИЛЛИН НЕОБРАТИМО ИНГИБИРУЕТ ФЕРМЕНТ, «УПРОЧНЯЮЩИЙ» КЛЕТОЧНУЮ СТЕНКУ БАКТЕРИЙ

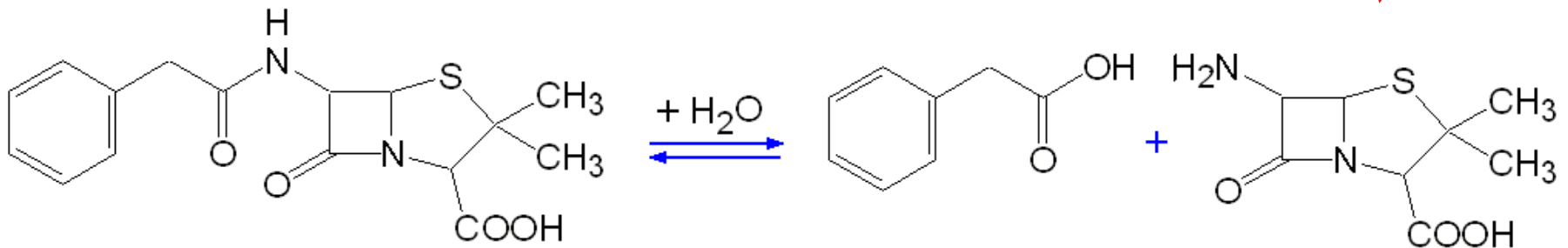


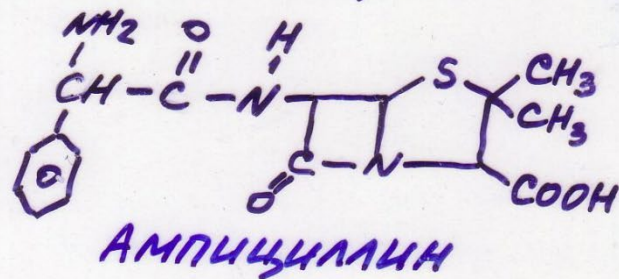
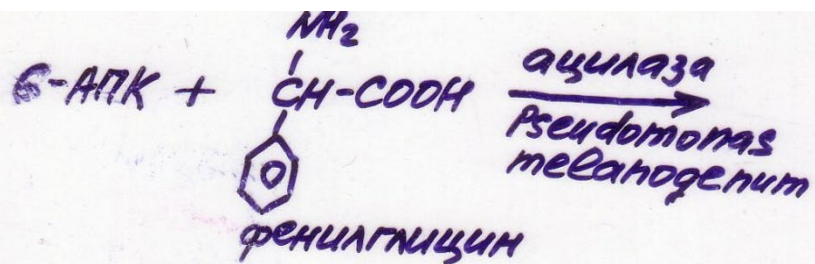
ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗА

Пенициллинацилаза



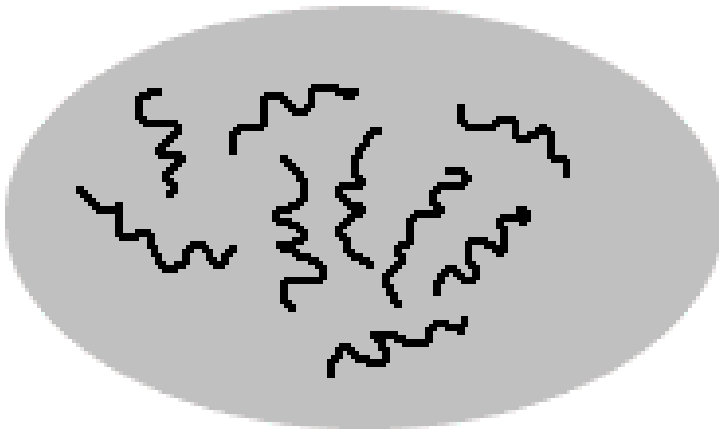
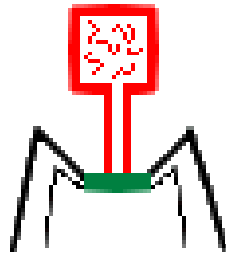
6-АПК – полупродукт в синтезе антибиотиков



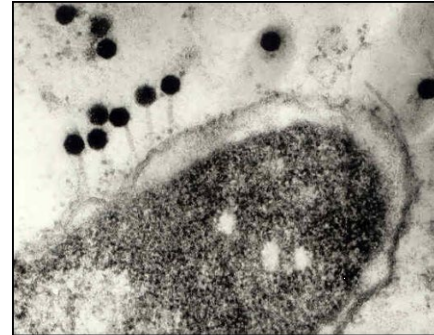


Бактериофаги (фаги) – вирусы,
способные инфицировать бактерии

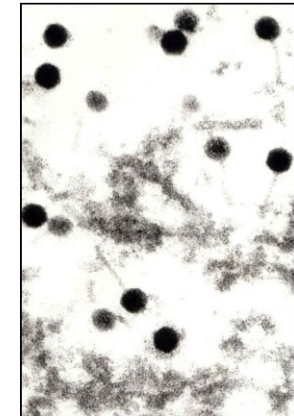
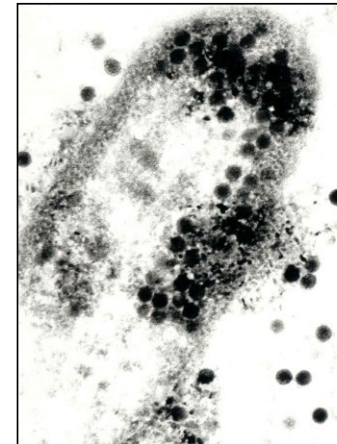
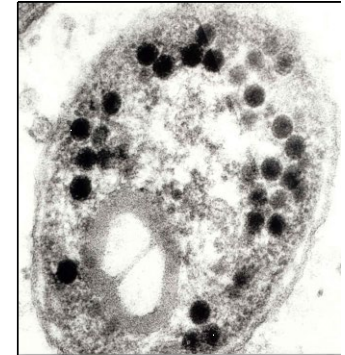
Отличаются от вирусов животных и
растений



20 min



30 min



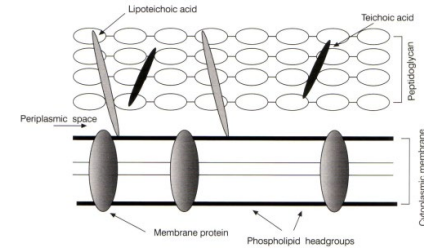
60 min

120 min

Клетки *S. typhimurium* остаются
морфологически неизменными в течение 20 и
30 мин после инфицирования (лизис не идет),
но генетический материал доставлен и фиды
размножаются внутри;

Лизис начинается через 60 мин и практически
заканчивается через 120 мин.

ФАГ-АССОЦИИРОВАННЫЙ ФЕРМЕНТ (PAL, PlyC), ОТВЕЧАЮЩИЙ ЗА ЛИЗИС ГРАМ-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ: *STREPTOCOCCUS PYOGENES*



S. pyogenes (стрептококк группы A) могут вызывать инфекции верхних дыхательных путей (тонзиллиты, фарингиты и т.д.), кожи (импетиго (пиодермия)), ревматизм и т.д.



Зона лизиса под действием PlyC на газоне стрептококков

Недостатки:

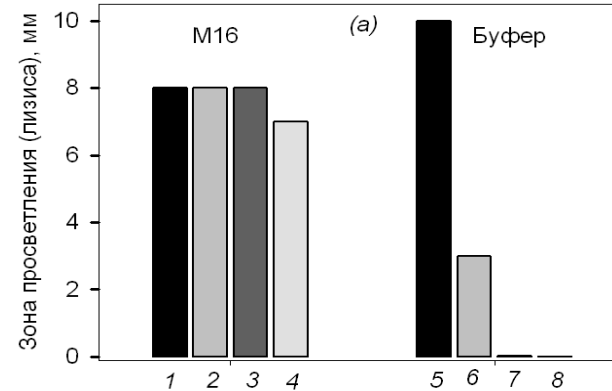
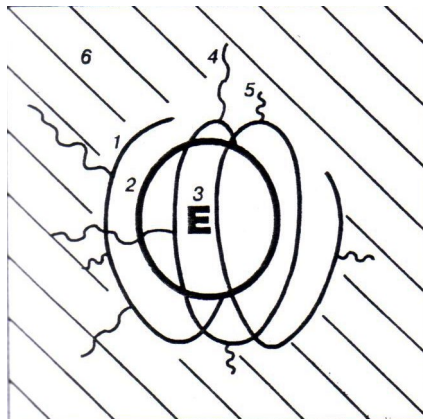
Чувствительность к T очень высока (низкая стабильность):

4°C - месяцы

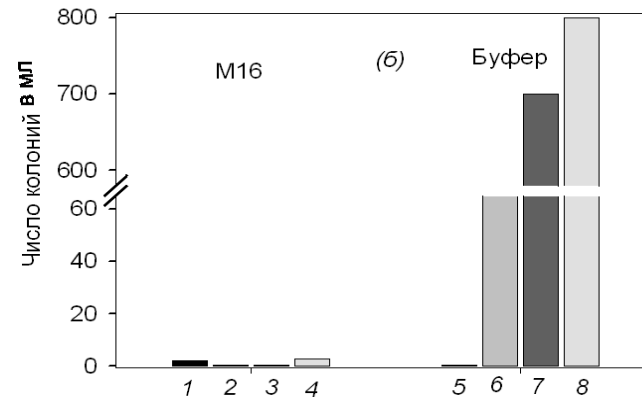
20°C - часы

37°C - минуты

Мицеллярно-полимерная композиция защищает фермент



Снижение эффективности



Рост колоний

PlyC в мицеллярно-полиэлектролитной композиции M16 эффективно работает против стрептококка и через 2 дня (2), 2 недели (3), 2 месяца (4). Фермент без композиции теряет эффективность уже через 2 дня (6), наблюдается рост числа новых колоний патогена (6, 7, 8).

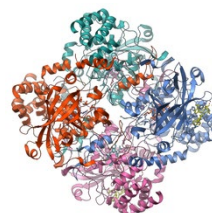
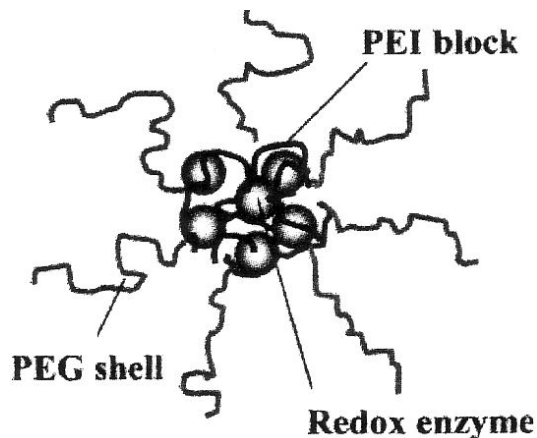
Воспалительные заболевания связаны со
свободно-радикальные процессами:

- усиление образования свободных радикалов (активные формы кислорода),
- истощение пула эндогенных антиоксидантов

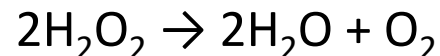
Наночастицы ферментов-антиоксидантов для доставки в ЦНС

Антиоксиданты

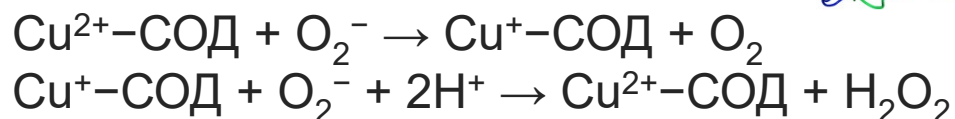
- Низкомолекулярные (витамин С, витамин Е, витамин А, убихинол, липоевая кислота)
- Антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза)



Каталаза



Супероксиддисмутаза 1



Получение наночастиц на основе комплексов и конъюгатов

- один из способов создания стабильных препаратов ферментов для доставки в клетки

E.V.Batrakova, et al, Bioconj Chem, 2007
N.L.Klyachko, et al, 2011

Увеит – воспаление сосудистой оболочки глаза

Удельный вес в структуре глазной патологии 5-12%

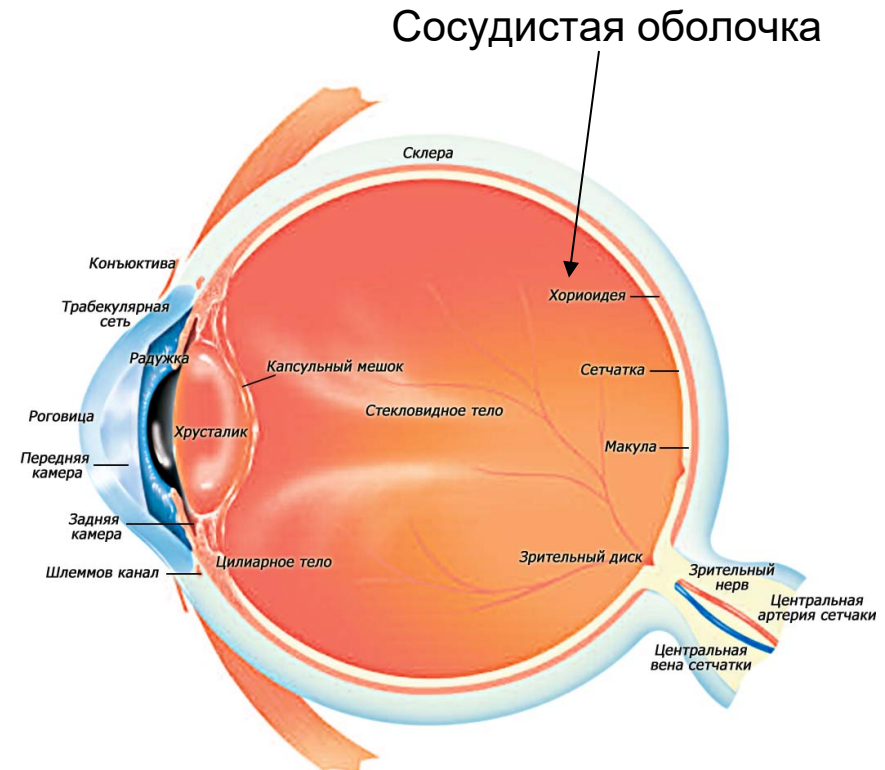
Удельный вес в структуре слепоты – 7-15%

У 25% детей, перенесших увеит, наступает слепота и слабовидение

Модель увеита позволяет следить за протеканием процессов в разных отделах глаза

Основные этиологические факторы:

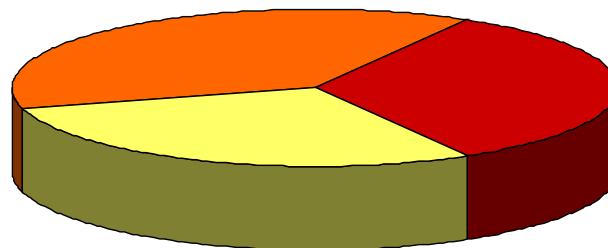
- инфекционные;
- инфекционно-аллергические;
- аллергические неинфекционные;
- аутоиммунные



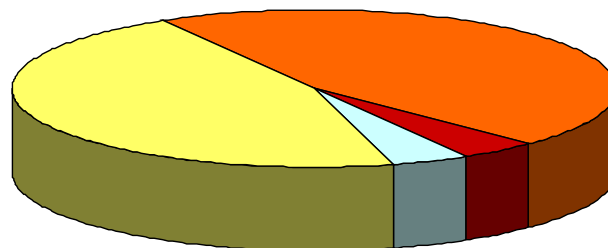
Клинические проявления увеита в острой фазе – гиперемия конъюнктивы, отек век, отек роговицы

клинические
признаки
выражены:

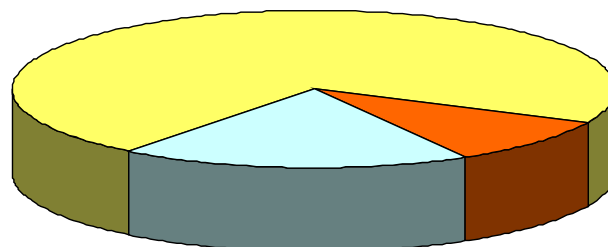
-  нет
-  слабо
-  средне
-  сильно



нелеченные
кролики



кролики,
получавшие
лечение СОД

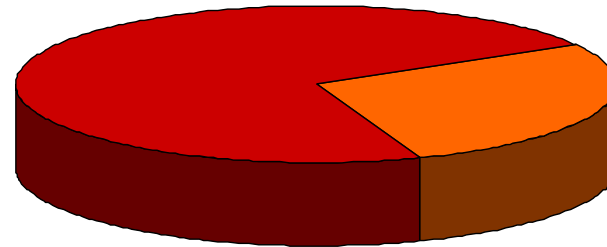


кролики,
получавшие
лечение
наноСОД

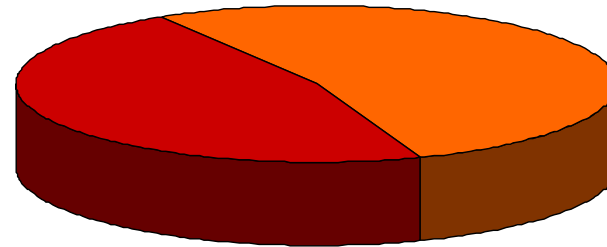
Клинические проявления увеита в острой фазе – помутнение хрусталика, фибриновые отложения, отек радужки

клинические
признаки
выражены:

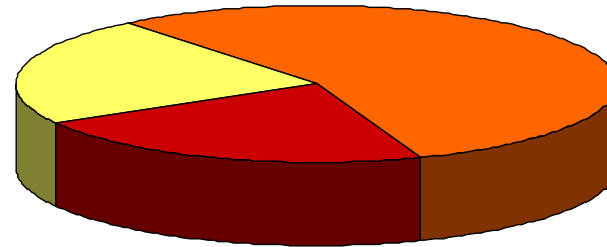
-  слабо
-  средне
-  сильно



нелеченые
кролики

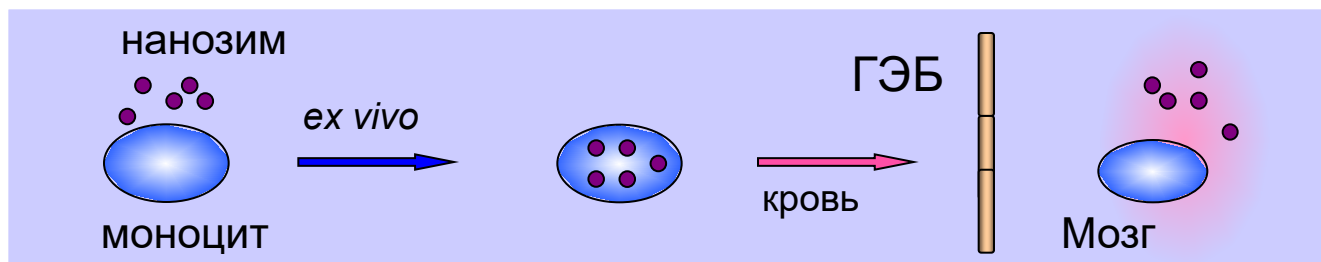
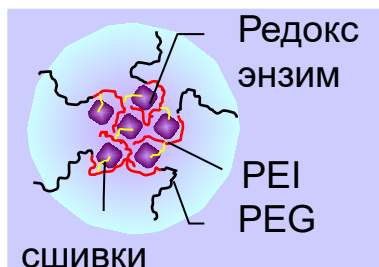


кролики,
получавшие
лечение СОД



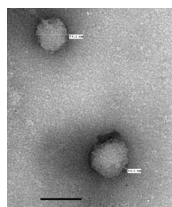
кролики,
получавшие
лечение
нанозимом

РедОкс “Нанозимы” для доставки в ЦНС

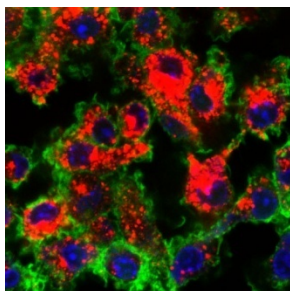


Загрузка МОНОЦИТОВ

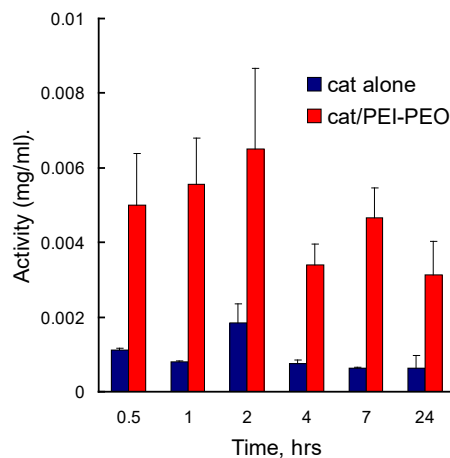
каталаза



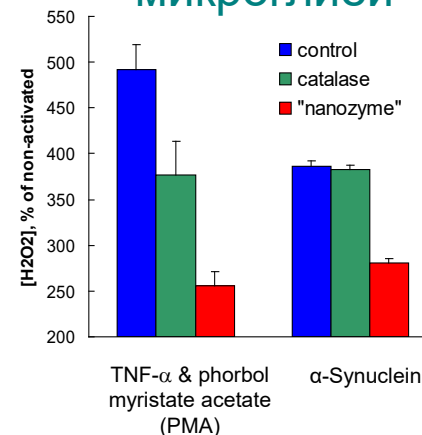
100 нм



Выделение из клеток



Антиоксидантная активность с микроглияй



Batrakova et al. Bioconj. Chem. 2007, 18:1498-1506

Klyachko, et al. Nanomedicine, 2012

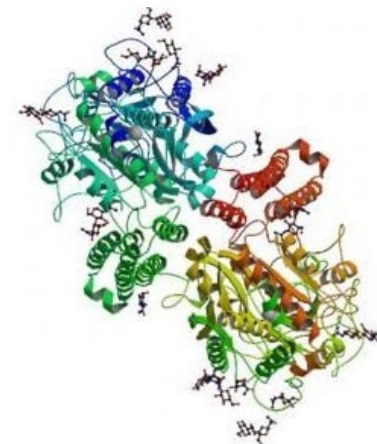
ФЕРМЕНТЫ В АНАЛИЗЕ

- Высокая чувствительность
- Высокая селективность

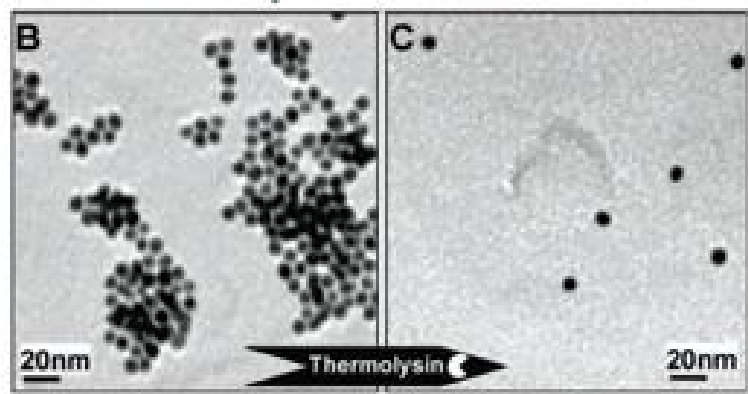
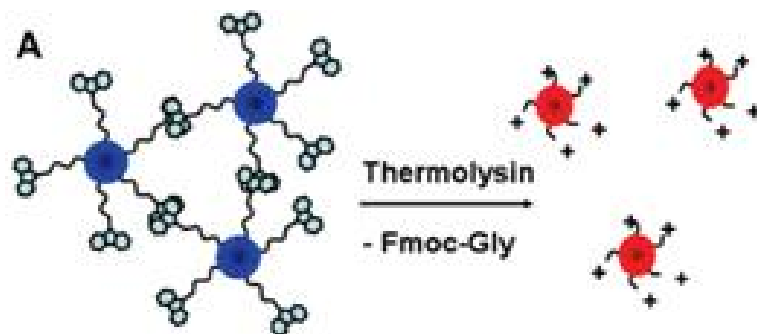
Примеры

1. Иммуноферментный анализ
(конкурентный и
неконкурентный, прямой и
непрямой)
2. Биolumинесцентный анализ
(определение АТФ)
3. Биосенсоры, биочипы
4. Ферменты как маркеры
заболеваний (креатинкиназа,
лактатдегидрогеназа,)

НАНОЧАСТИЦЫ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ



Alpha 1-
antichymotrypsin-PSA
(ACT-PSA)



Наночастицы золота (10нм)

Короткие спец пептиды на поверхности
Пептиды связывают частицы друг с другом с
помощью спец линкеров

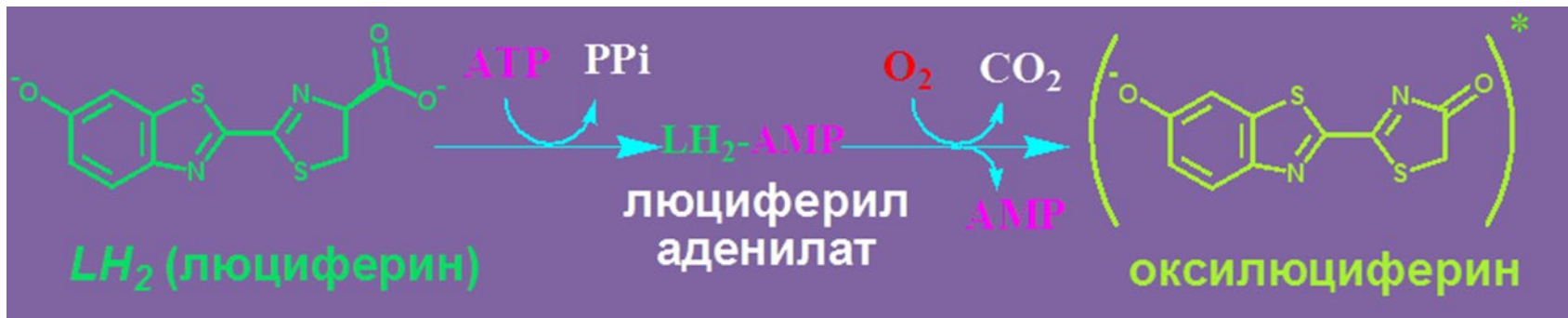
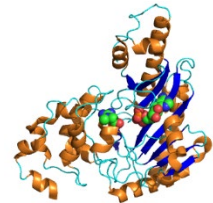
Связанные наночастицы – голубая окраска
Присутствие спец фермента **nACT-PSA** при
раке простаты – «разрываются» пептидные
связи между частицами – красная окраска

non-alpha1-antichymotrypsin-complexed
prostate-specific antigen

*Laromaine, A. et al J. Am. Chem. Soc. 129,
4156-4157 (2007)*



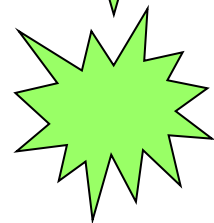
Биолюминесцентная реакция, катализируемая люциферазами светляков



Определение АТР – области применения

- Контроль за скоростью ферментации
пищевая и фарм. пром, производство напитков
- Обнаружение микробного заражения
Контроль качества продуктов в производстве
пищи, лекарств, косметики и т.д.
- Измерение биомассы в воде
Контроль за процессами обработки сточных вод
- Детекция наличия жизни
Космические исследования
- Определение креатинфосфокиназы в сыворотке крови
(КФК синтез АТР, люцифераза использует АТР)
Медицина. Повышение конц КФК - инфаркт

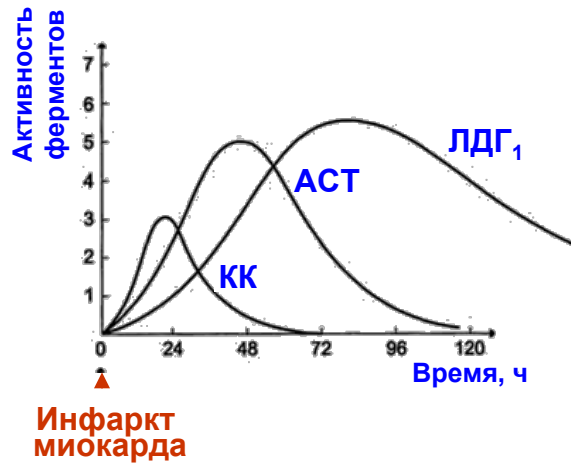
$h\nu$



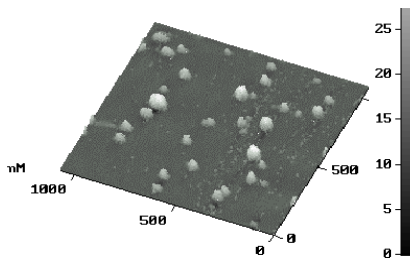
$\lambda_{max} = 540-570 \text{ нм}$

Высокая специфичность к АТР,
Высокий квантовый выход
Высокочувствительный
анализ АТР
(до 10^{-15} моль/образец)

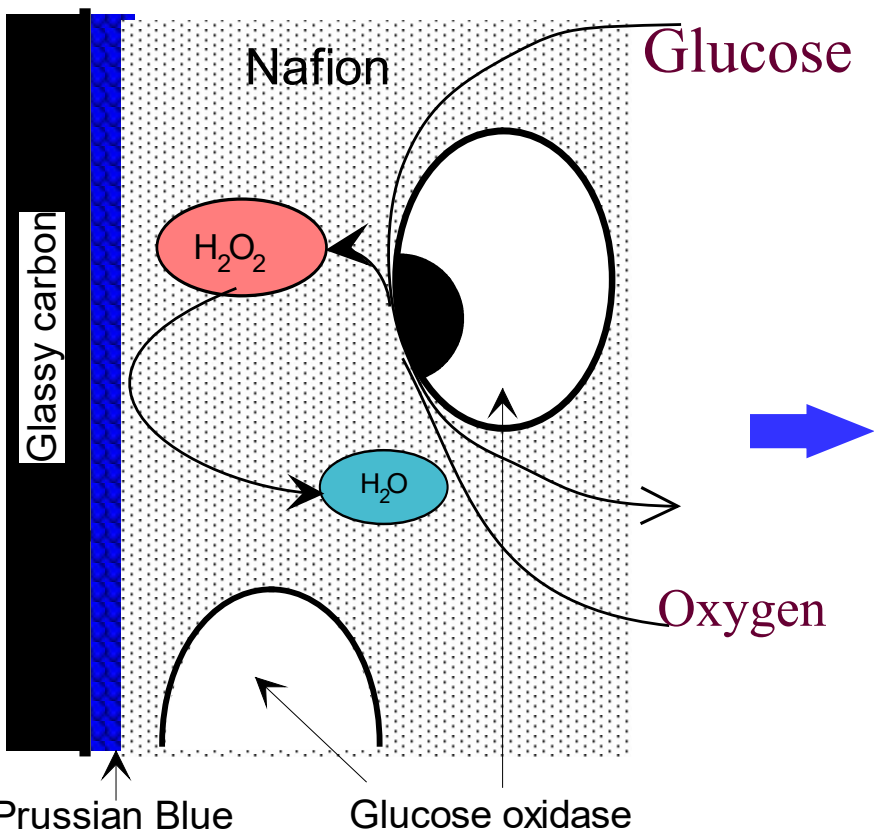
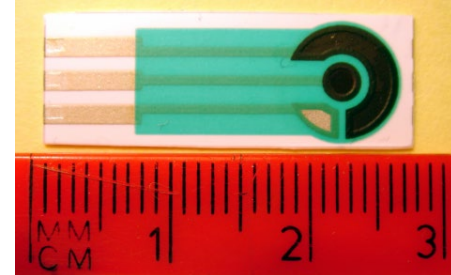
ДИАГНОСТИКА ИНФАРКТА МИОКАРДА



АСТ (AST)
аспартатаминотрансфераза



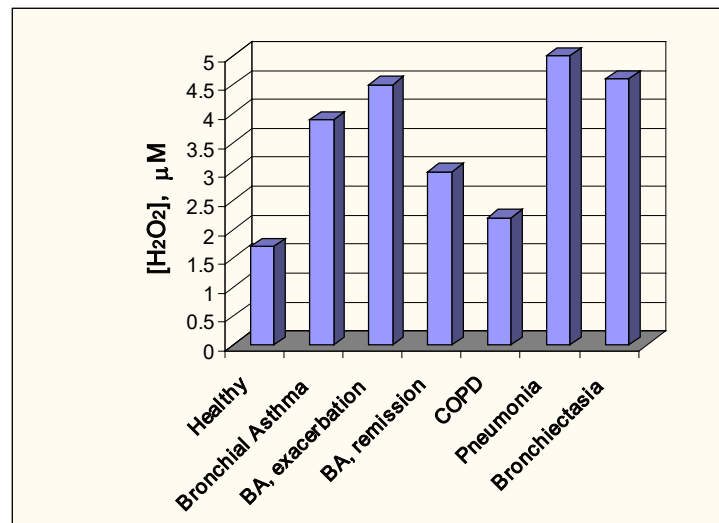
Биосенсоры, основанные на электрокатализе (наноструктурированные поверхности)



Lactate in sweat



Hydrogen peroxide in EBC



Белки – настраиваемые «кирпичики»

Мутантные белки

- Эволюция оптимизирует свойства белков под нужды организма
- Приемы генной инженерии для получения белков с заданными свойствами

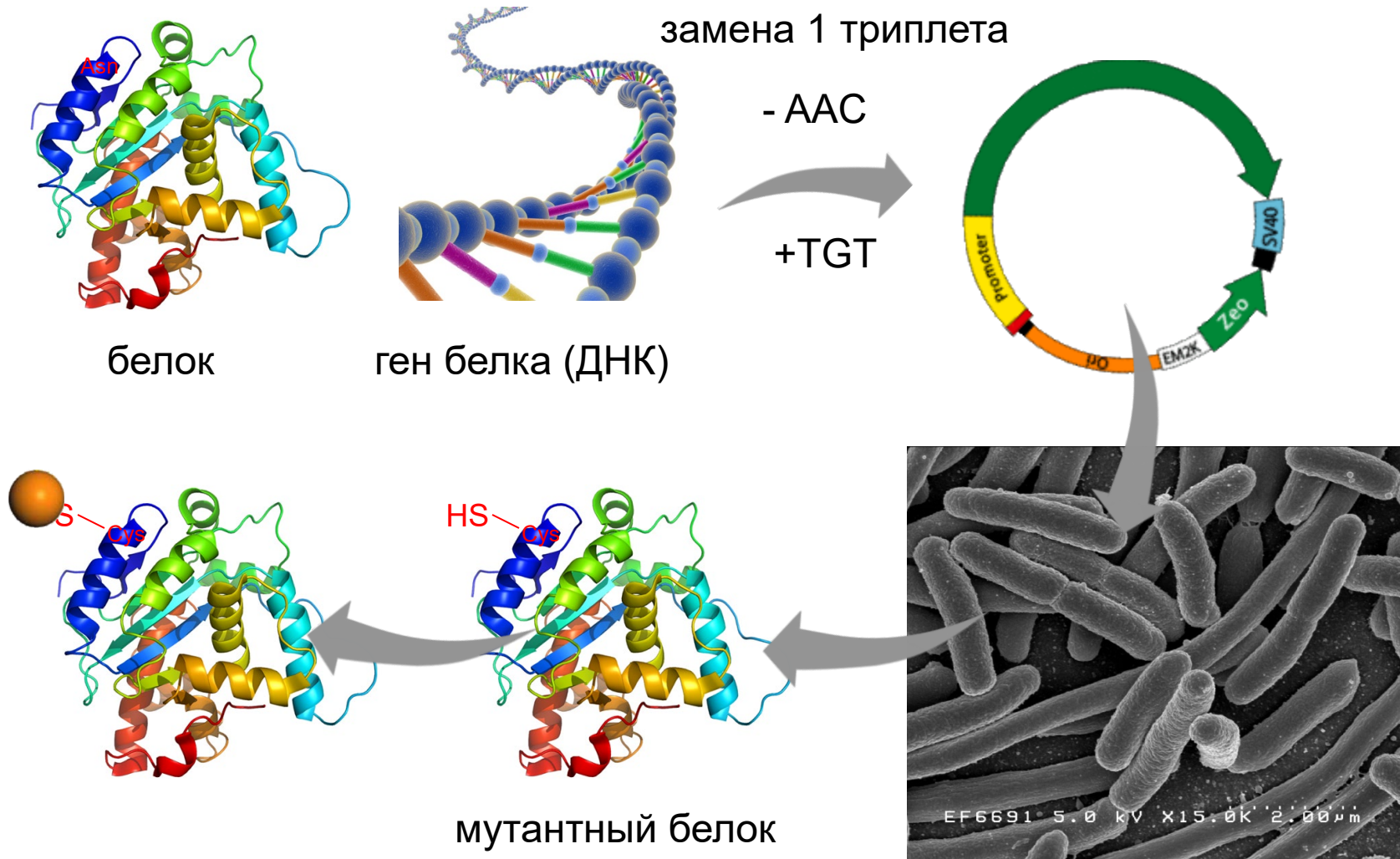
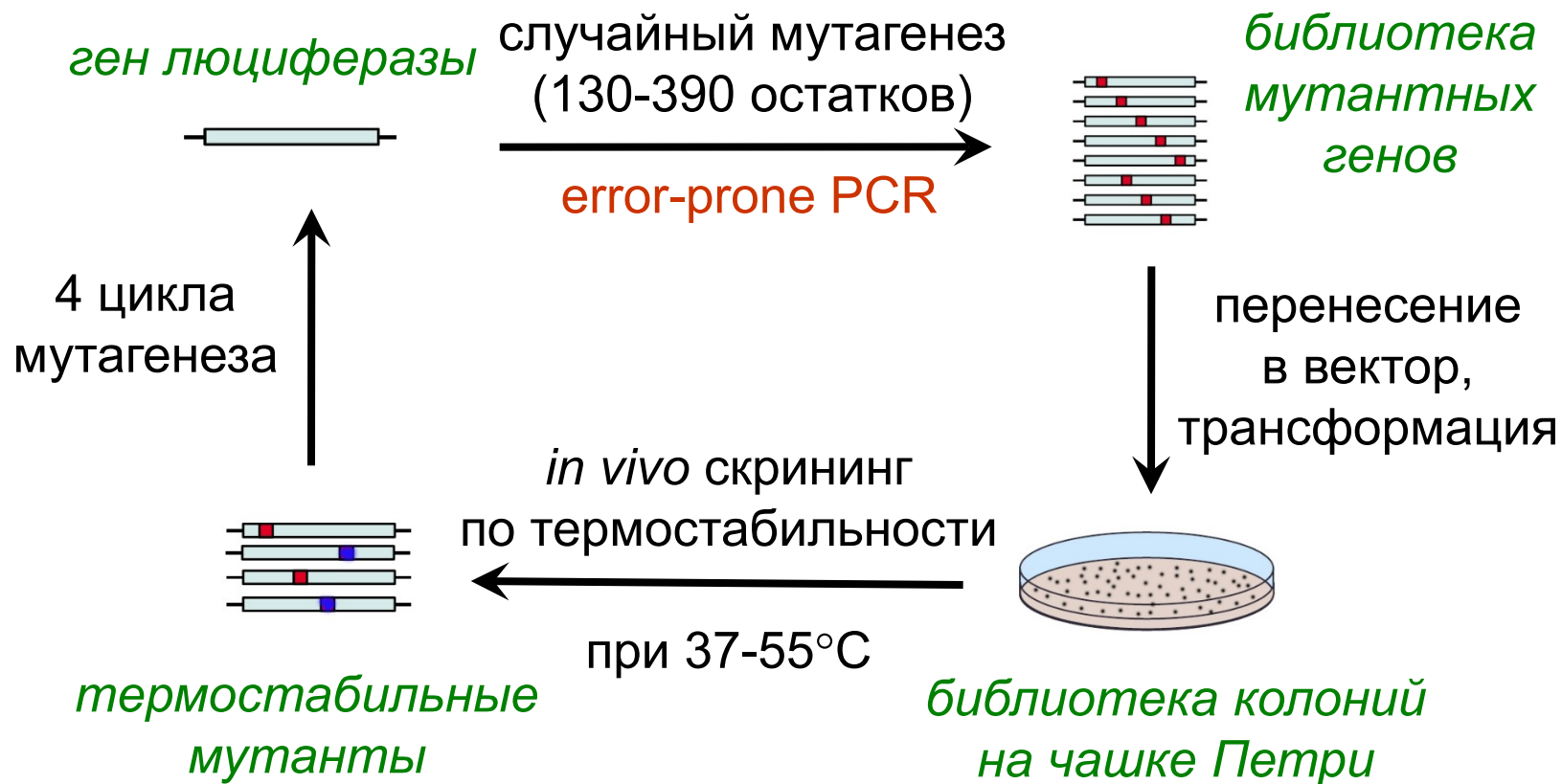


Схема повышения термостабильности люциферазы методом случайного мутагенеза



Расположение замен мутанта 4TS в структуре люциферазы и термостабильность ферментов

