

ФЕРМЕНТЫ – БЕЛКИ С ОСОБОЙ ФУНКЦИЕЙ КАТАЛИЗА

2. Механизмы действия ферментов

3. Применение ферментов

Наталья Львовна Клячко

Профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
кафедра химической энзимологии

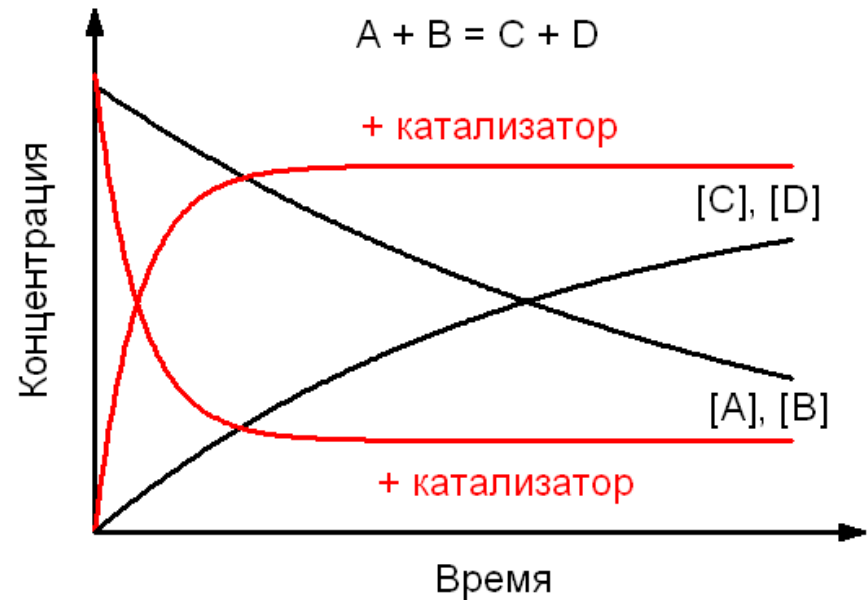
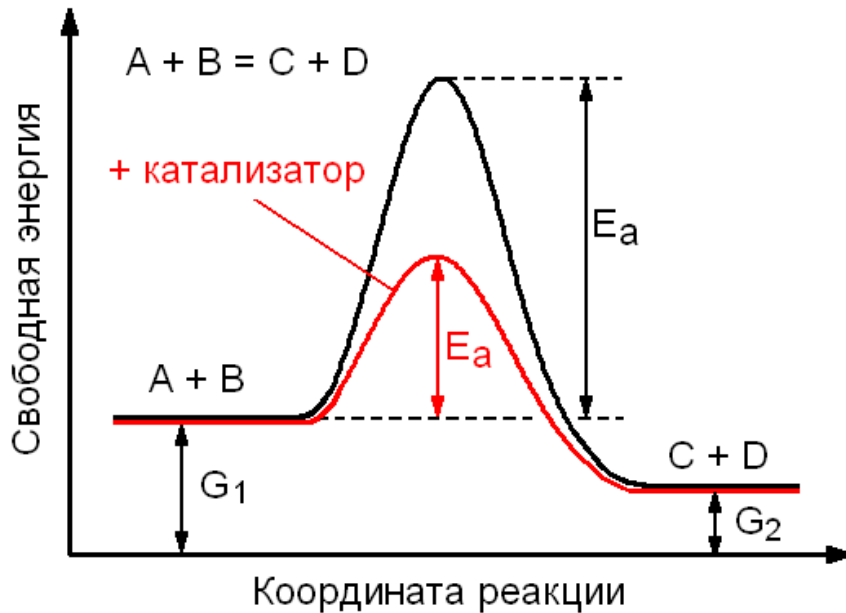
klyachko@enzyme.chem.msu.ru
nlklyachko@gmail.com

<https://sdo.chem.msu.ru/>

**В 5х следующих слайдах кратко
напоминание о материале прошлой лекции**

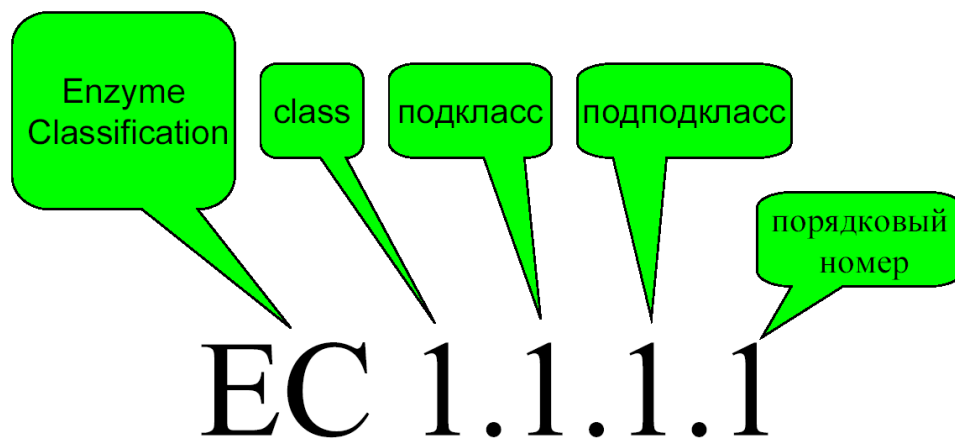


ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ КАТАЛИЗА



- 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

Классификация ферментов – Е.С. (Enzyme Classification)



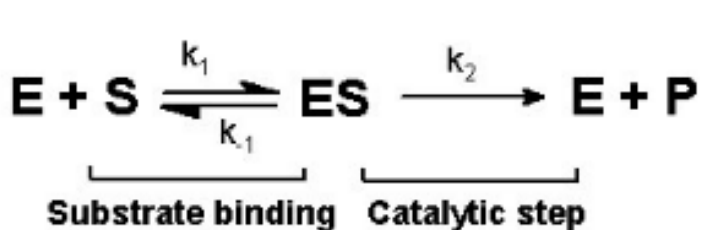
1. Оксидоредуктазы
2. Трансферазы
3. Гидролазы
4. Лиазы
5. Изомеразы
6. Лигазы
7. Транслоказы



ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА

Уравнение Михаэлиса-Ментен — уравнение наиболее известной модели ферментативной кинетики.

Названо в честь **Леонора Михаэлиса** и **Мод Леоноры Ментен**. Статья в 1913 – провели математический анализ ферментативной кинетики



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

Уравнение описывает зависимость скорости реакции, катализируемой ферментом, от концентрации субстрата при определённых общепринятых допущениях

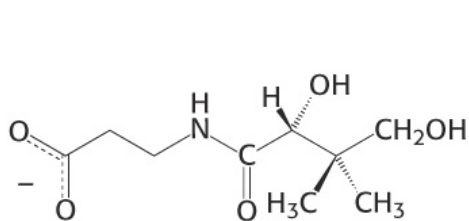
где
 V_m — максимальная скорость реакции,
 равная $k_{cat} E_0$
 K_M — константа Михаэлиса, равная
 концентрации субстрата, при которой
 скорость реакции составляет половину
 от максимальной;
 S — концентрация субстрата.

Фермент	Число оборотов в 1 мин при 37° C
Карбоангидраза	36 000 000
b-Амилаза	1 100 000
Фосфоглюкомутаза	1 240

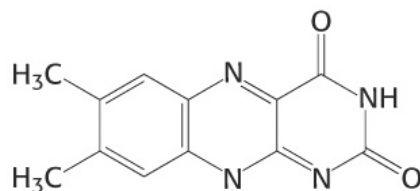
ВИТАМИНЫ И КОФЕРМЕНТЫ

Витамины – предшественники коферментов

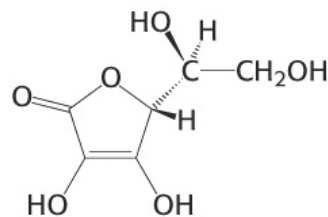
Коферменты – небольшие органические молекулы (кофакторы), необходимые для активности многих ферментов



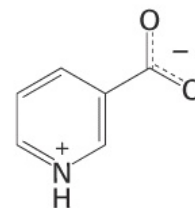
Vitamin B₅
(Pantothenate)



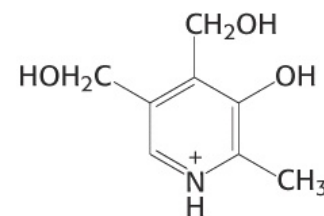
Vitamin B₂
(Riboflavin)



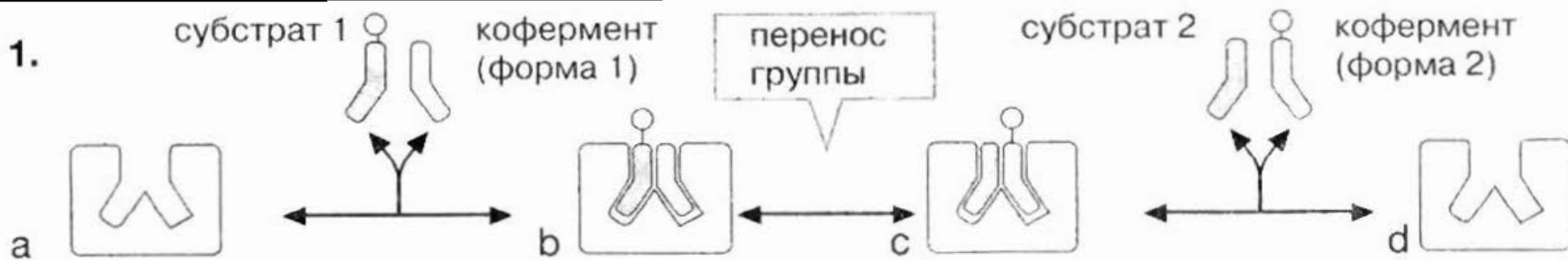
Vitamin C
(Ascorbic acid)



Vitamin B₃
(Niacin)

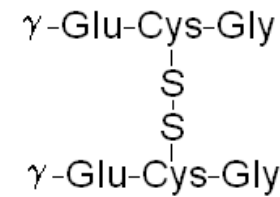


Vitamin B₆
(Pyridoxine)

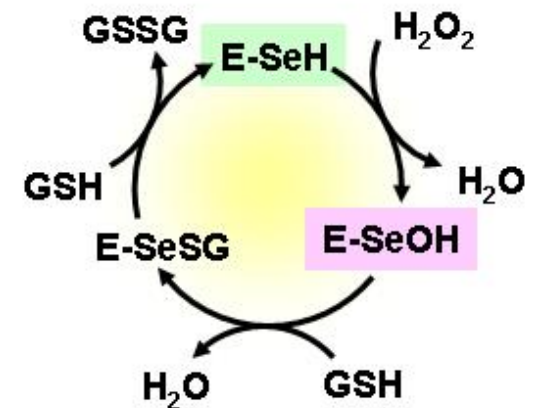


Неорганические ионы в составе ферментов

Ион металла	Фермент
Fe ³⁺ , Ca ²⁺	Пероксидаза
Zn ²⁺	Карбоангидраза Алкогольдегидрогеназа
Cu ²⁺ , Cu ¹⁺	Тирозиназа, Лакказа
Mg ²⁺	Гексокиназа Глюкозо-6-фосфатаза
Mn ²⁺	Аргиназа
K ⁺	Пируваткиназа (и Mg ²⁺)
Se ⁻²	Глутатионпероксидаза
Cu ²⁺ , Zn ²⁺	Супероксиддисмутаза



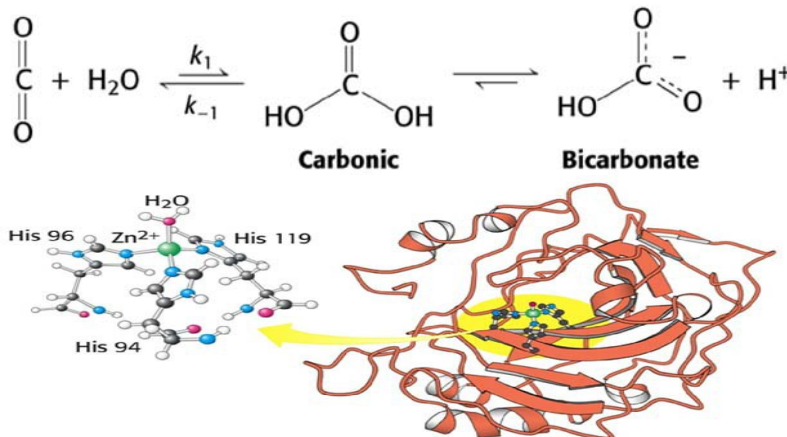
Cf. GPx cycle



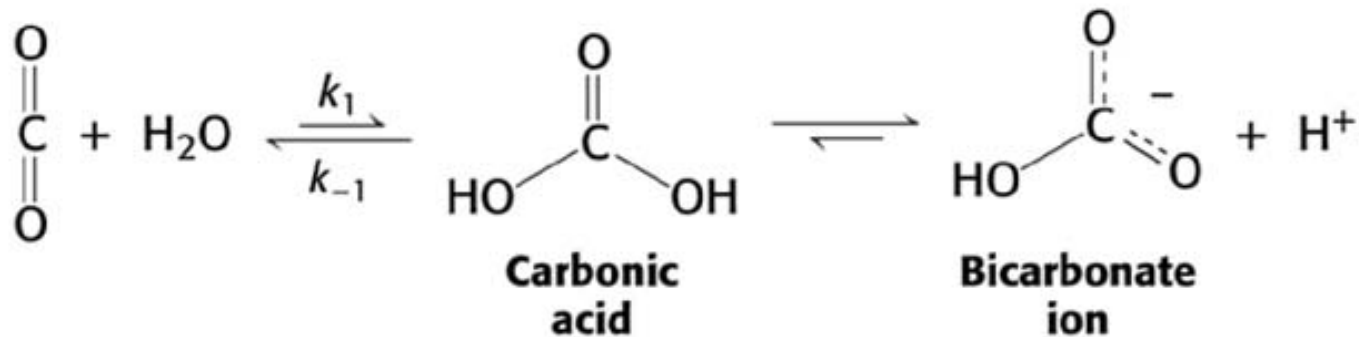
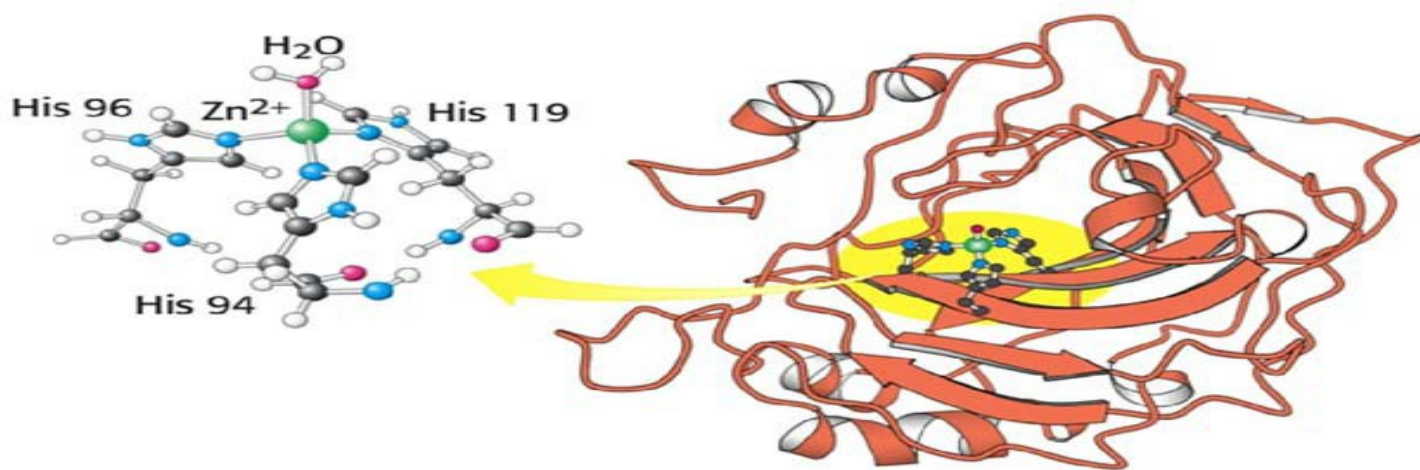
Глутатионпероксидаза



$$k_{\text{cat}} = 10^6 \text{ s}^{-1}$$



Карбоангидраза



В тканях, где **CO₂ много**, реакция идет в сторону образования угольной кислоты. В легких же это соединение, будучи непрочным, распадается, т. е. реакция идет в сторону освобождения углекислого газа.

Угольная кислота распадается в **2000 раз медленнее**, чем это нужно для отдачи углекислого газа быстро проносящейся мимо альвеол кровью.

Как организм выходит из этого положения?

Работает фермент, названный карбоангидразой

Carbonic Anhydrase (E.C. 4.2.1.1)

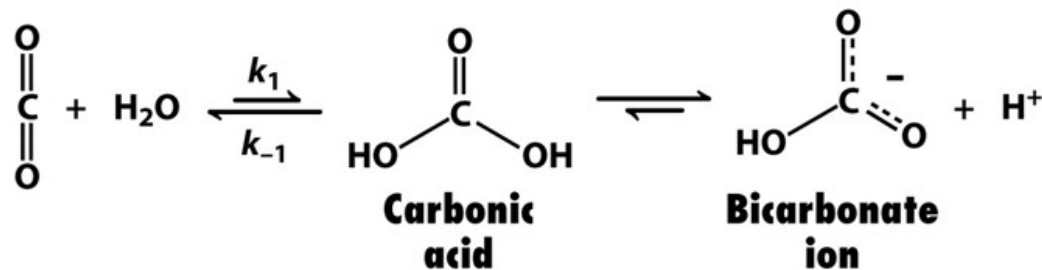
Карбоангидра́за (синоним:
карбонатдегидратаза, карбонатгидролизаза)



У людей существует не менее 13 карбоангидраз

Участвуют в различных биологических процессах, в том числе дыхания, кальцификации, кислотно-щелочного баланса, резорбции костей, формирование внутриглазной жидкости, спинномозговой жидкости, слюны, и желудочной кислоты

$$k_{\text{cat}} = 10^6 \text{ s}^{-1}$$

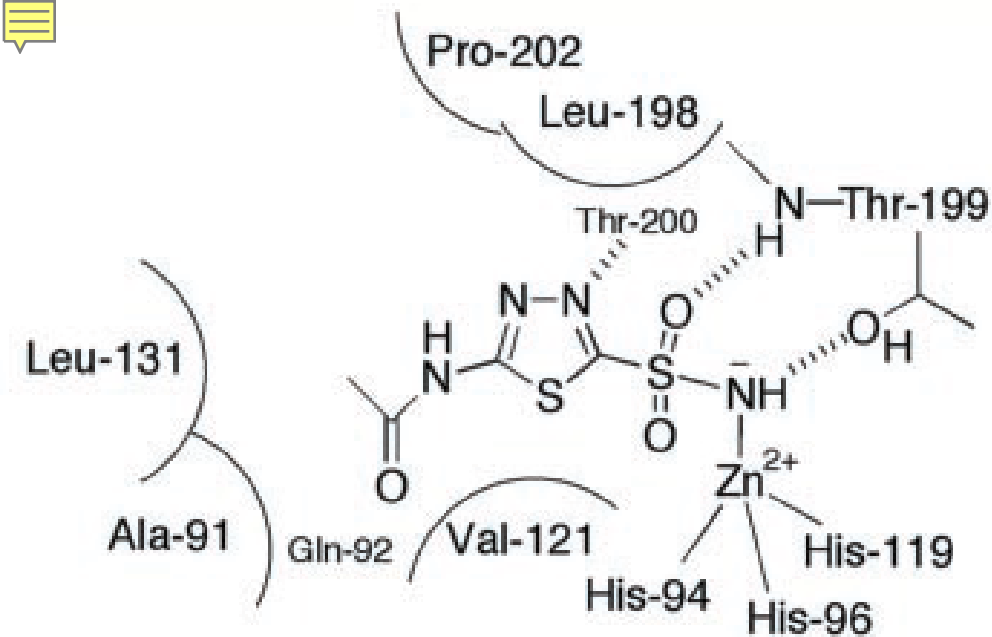


- СА локализована в красных клетках крови (эритроциты)
- Содержит от 0.31 до 0.34% цинка
- **Важно**, т.к. это **первая известная физиологическая функция цинка**

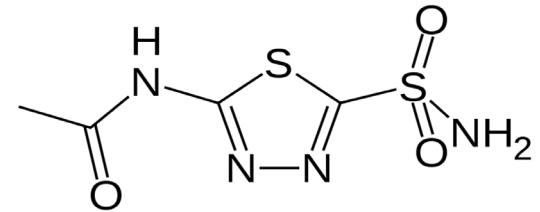
Активность СА в крови в норме довольно постоянна, но при некоторых патологических состояниях она резко меняется.

Повышение активности в крови при анемиях различного генеза, нарушениях кровообращения II—III степени, некоторых заболеваниях легких (бронхоэктазах, пневмосклерозе), а также при беременности.

Снижение активности в крови происходит при ацидозе почечного генеза, гипертиреозе.



Acetazolamide - Диуретик. Sold as the drug Diamox
<http://jpet.aspetjournals.org/content/115/3/251.abstract>



Ионизованная сульфонамидная NH-группа коорд с Zn^{+2} и донирует H-связь Thr-199.
 Доп контакты (с H-связями) - между N основной цепи Thr-199 и O сульфонамида, и между OH-группой Thr-200 и атомом азота в 1,3,4-тиадиазолиновом кольце

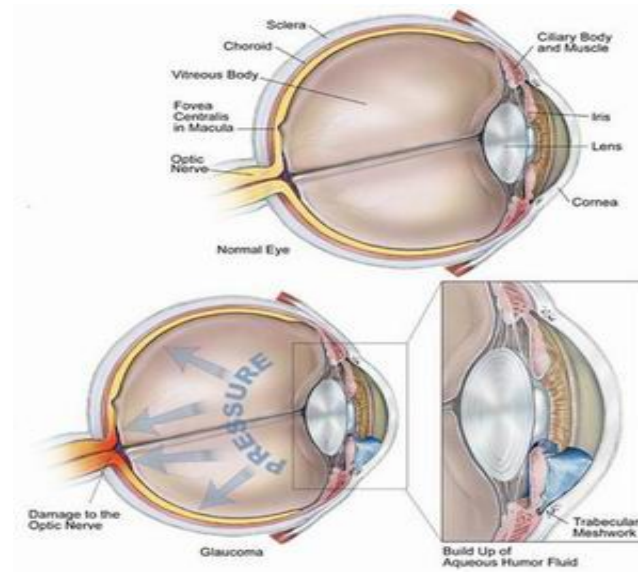
Ингибиторы СА: Ароматические сульфонамиды – acetazolamide.

1 μM acetazolamide снижает на 85% акт СА в клетках COS-7 (фибробласт-подобные клетки почек зелен обезьяны) (повышен внеклеточный pH сдвиг в нейронах)

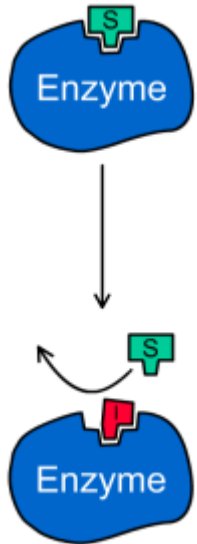
Ингибиторы СА – быстро снижают внутриглазное давление. Лечение глаукомы

Carbonic anhydrase inhibitors are **applicable during emergencies** because they are able to rapidly reduce the pressure that has built up inside the eye by 40% to 60%. The less fluid that is allowed to build up yields less pressure behind the eye.

http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb49_2.html



РЕГУЛЯЦИЯ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ



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

Ингибиторы обратимые

Конкурентные

Неконкурентные

Бесконкурентные

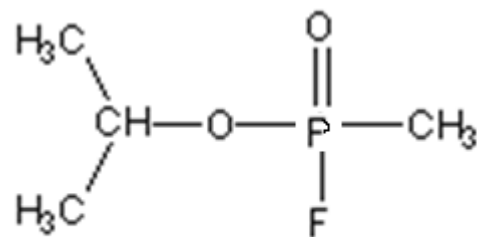
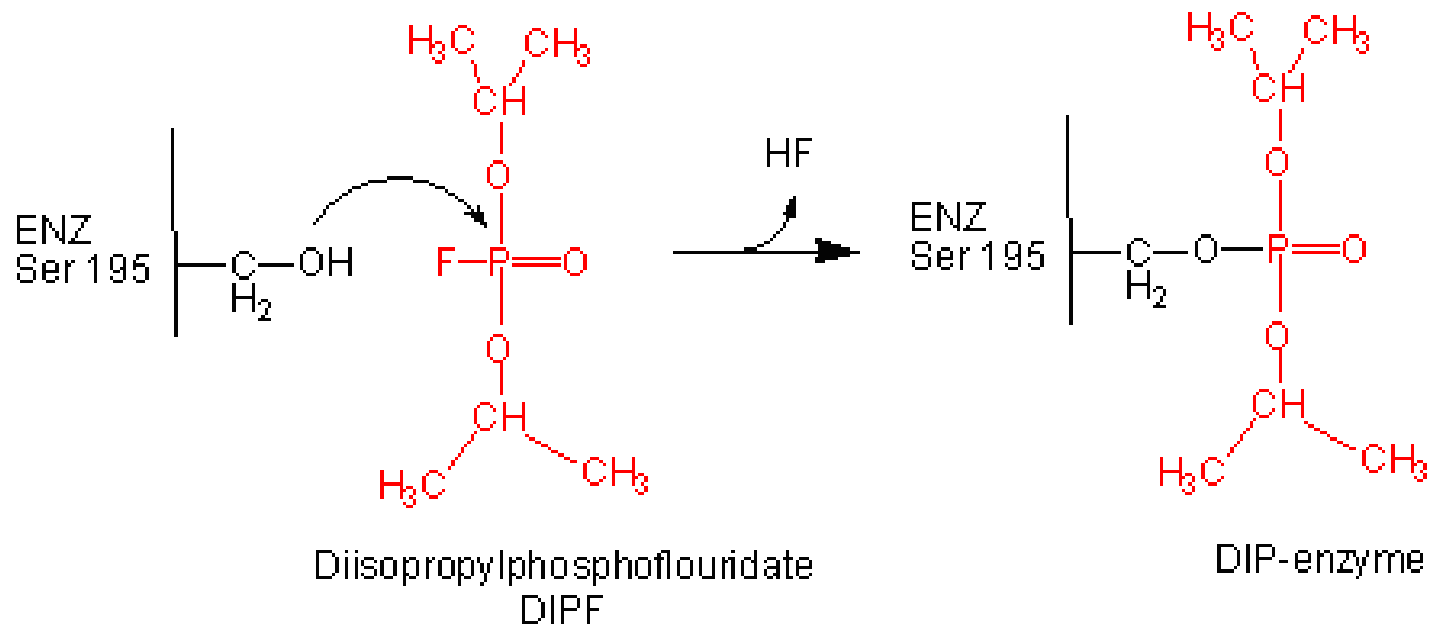
Ингибиторы необратимые

Модификаторы

Субстратоподобные
(суицидные)

НЕОБРАТИМОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ СЕРИНОВЫХ ГИДРОЛАЗ

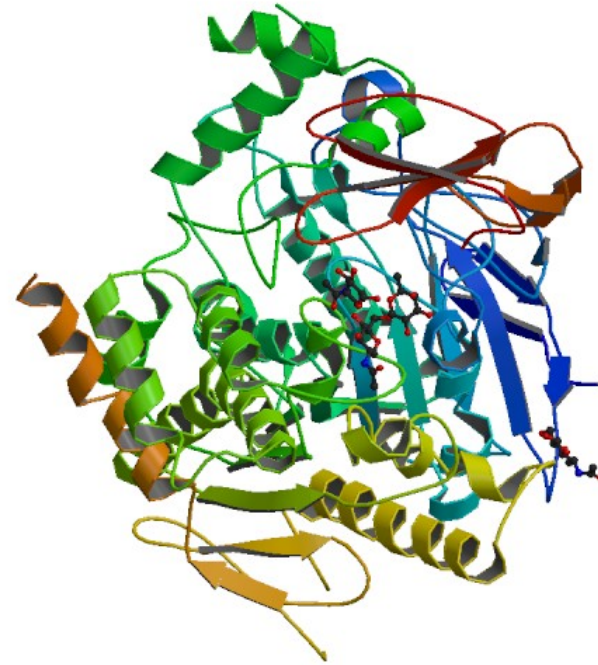
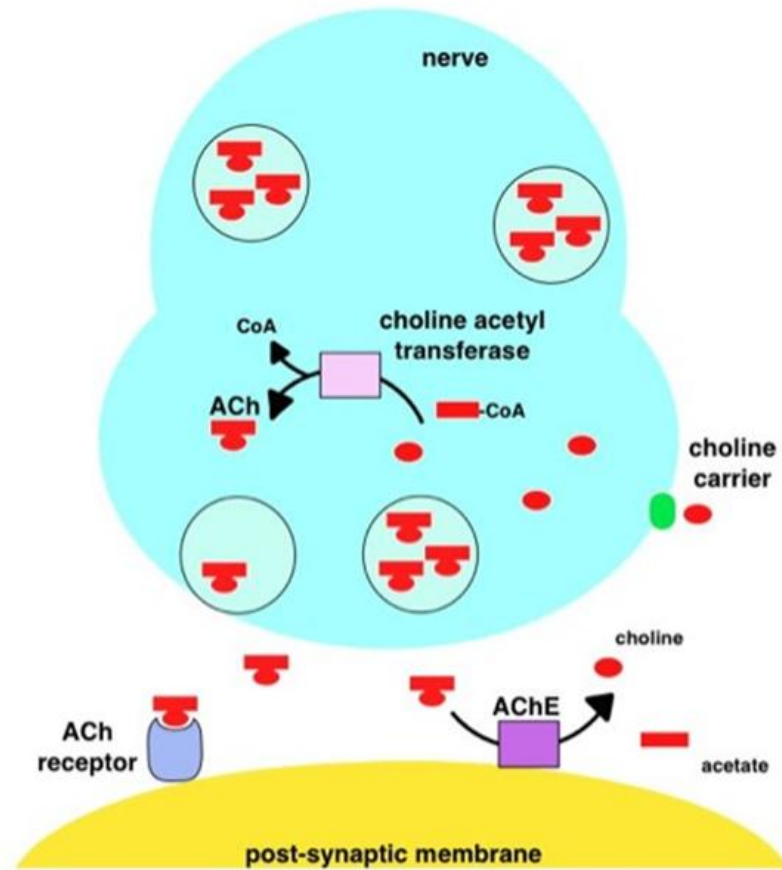
(Химотрипсин, холинэстеразы)



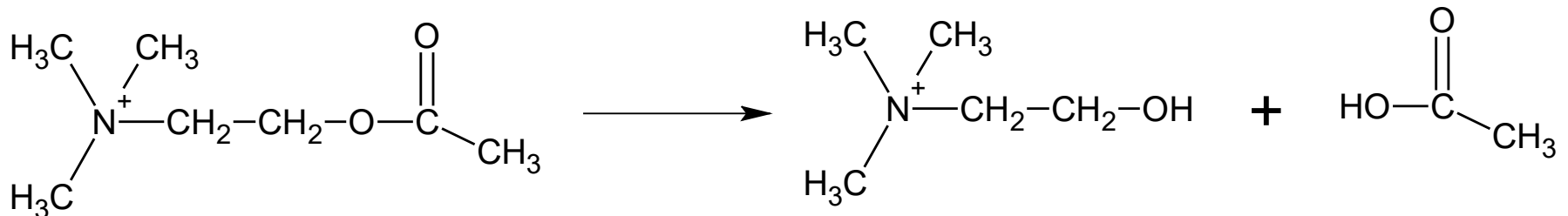
sarin

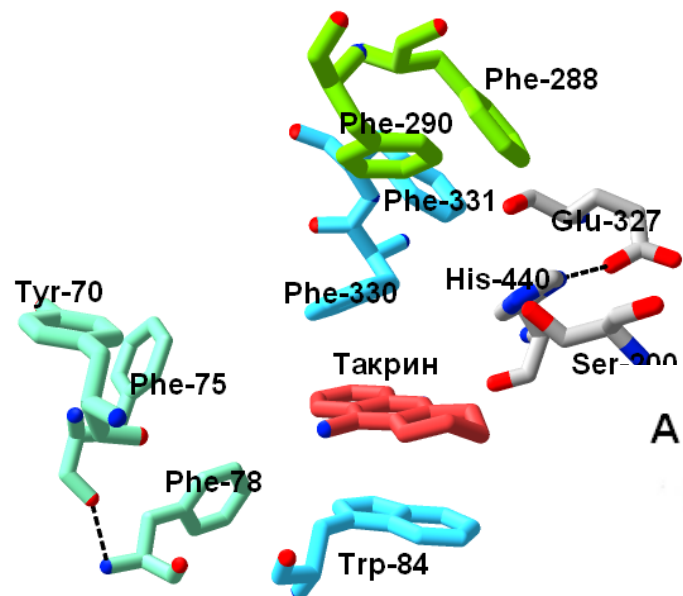
Органофосфатгидролаза перерабатывает
фосфорорганические соединения

Ацетилхолинэстераза

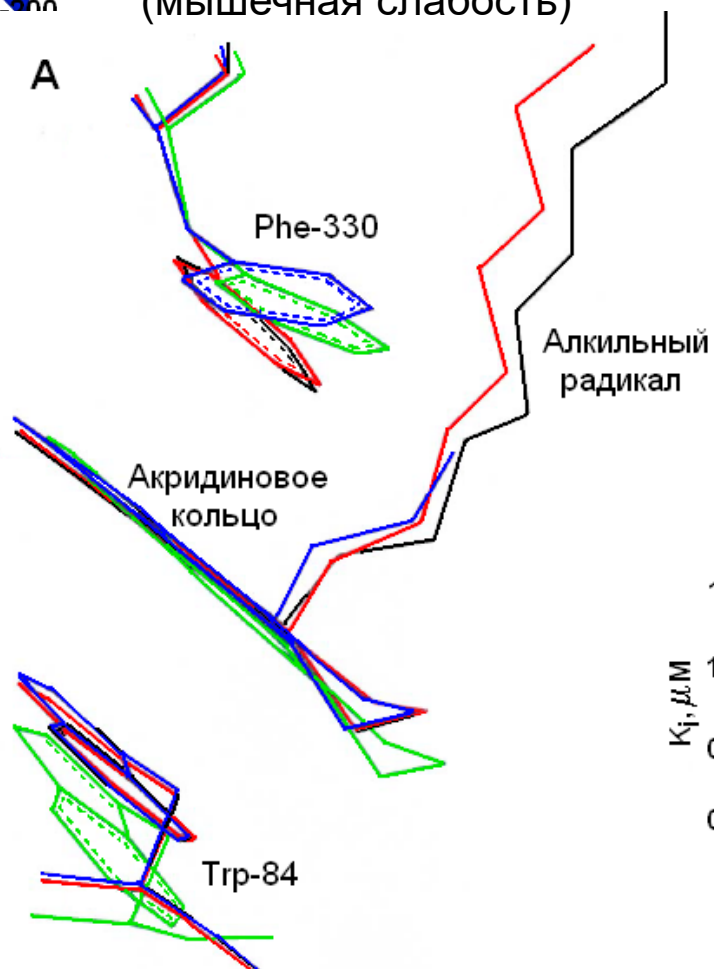


Фермент функционирует в холинэргических синапсах, обеспечивая циркуляцию нейромедиатора – ацетилхолина. $k_{\text{cat}} = 1.4 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$, $K_m = 9 \cdot 10^{-5} \text{ М}$





А



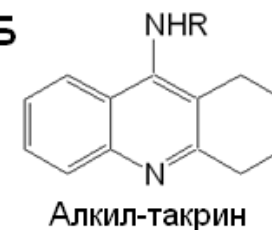
ТАКРИН – обратимый конкурентный ингибитор ацетилхолинэстеразы

Физостигмин – необратимый ингибитор

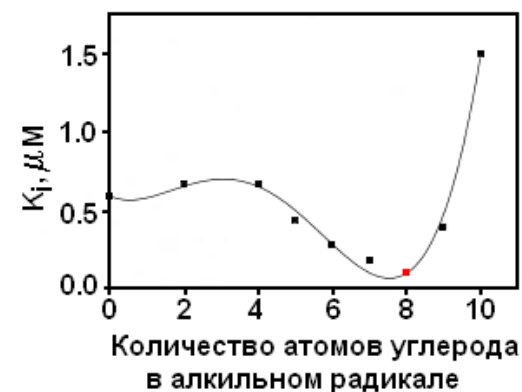
(терапия болезни Альцгеймера)

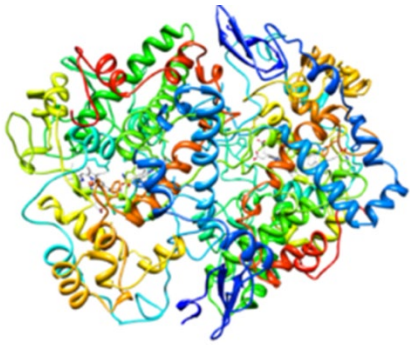
Пиридостигмина бромид – ингибитор в терапии аутоиммунного заболевания *Myasthenia gravis* (мышечная слабость)

Б



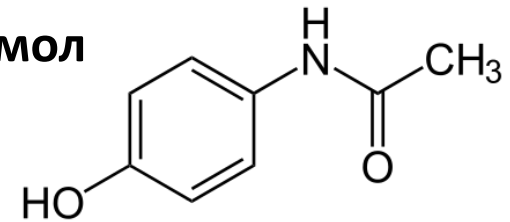
В





Циклооксигеназы

Парацетамол



Парацетамол

Блокирует обе формы фермента циклооксигеназы (ЦОГ1 и ЦОГ2), ингибируя тем самым синтез простагландинов (Pg). ...

В западных странах известен под названием Acetaminophen

Одномоментный приём более 10 г парацетамола у взрослых или более 140 мг/кг у детей – отравление → тяжёлое поражением печени.

Причина — истощение запасов глутатиона и накопление **промежуточных продуктов метаболизма парацетамола**, обладающих **гепатотоксическим действием**.

Подобная картина при приёме обычных доз препарата в случае сопутствующего применения индукторов ферментов цитохрома Р-450 и у алкоголиков (или употреблении систематически алкоголь (для мужчин —свыше 700 мл пива или 200 мл вина в день, для женщин — дозы в 2 раза меньше)

В периферических тканях клеточные пероксидазы нейтрализуют влияние парацетамола на ЦОГ, что объясняет практически полное отсутствие противовоспалительного эффекта.

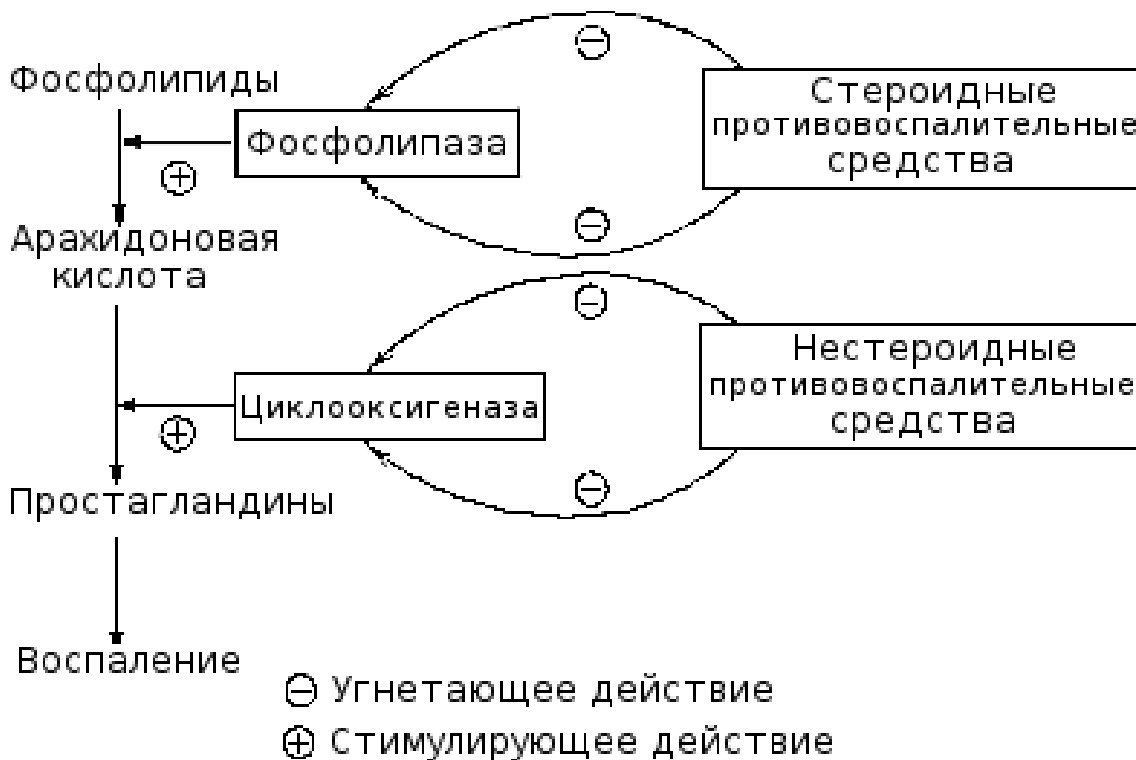
Боль — наиболее распространенный ведущий (основной) симптом многих заболеваний и патологических состояний.

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.

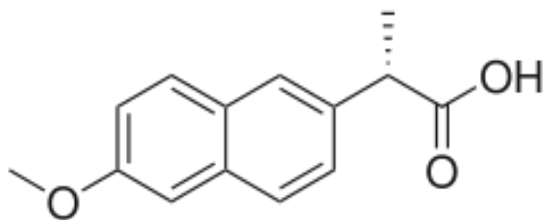


Стероидные препараты

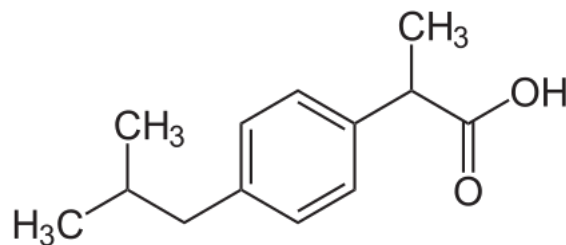
угнетают активность фермента **фосфолипазы** и за счет этого нарушают образование арахидоновой кислоты.

Нестероидные препараты

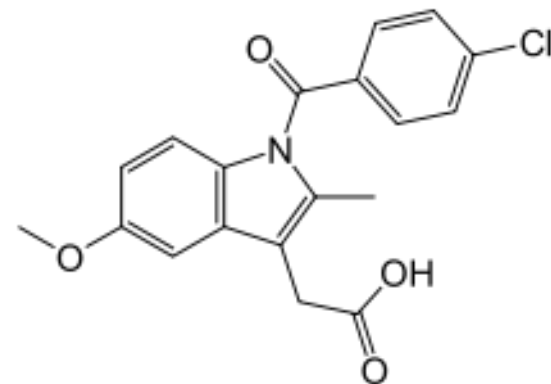
блокируют **циклооксигеназу**, с помощью которой из арахидоновой кислоты образуются простагландины. Таким образом, стероидные и нестероидные противовоспалительные средства **препятствуют образованию простагландинов на разных этапах их синтеза**



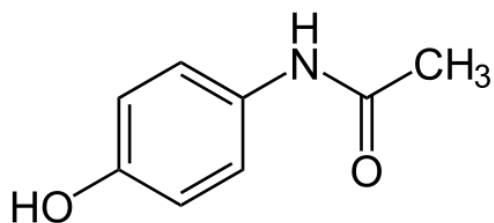
Напроксен



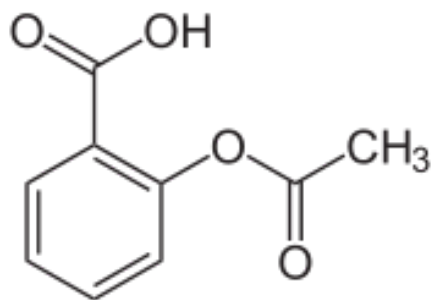
Ибупрофен



Индометацин

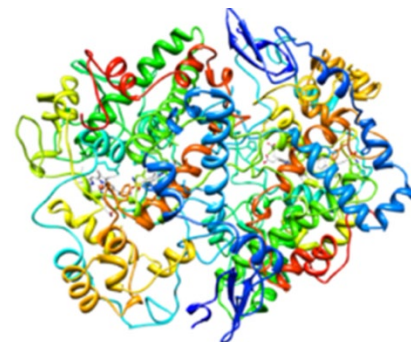


Парацетамол

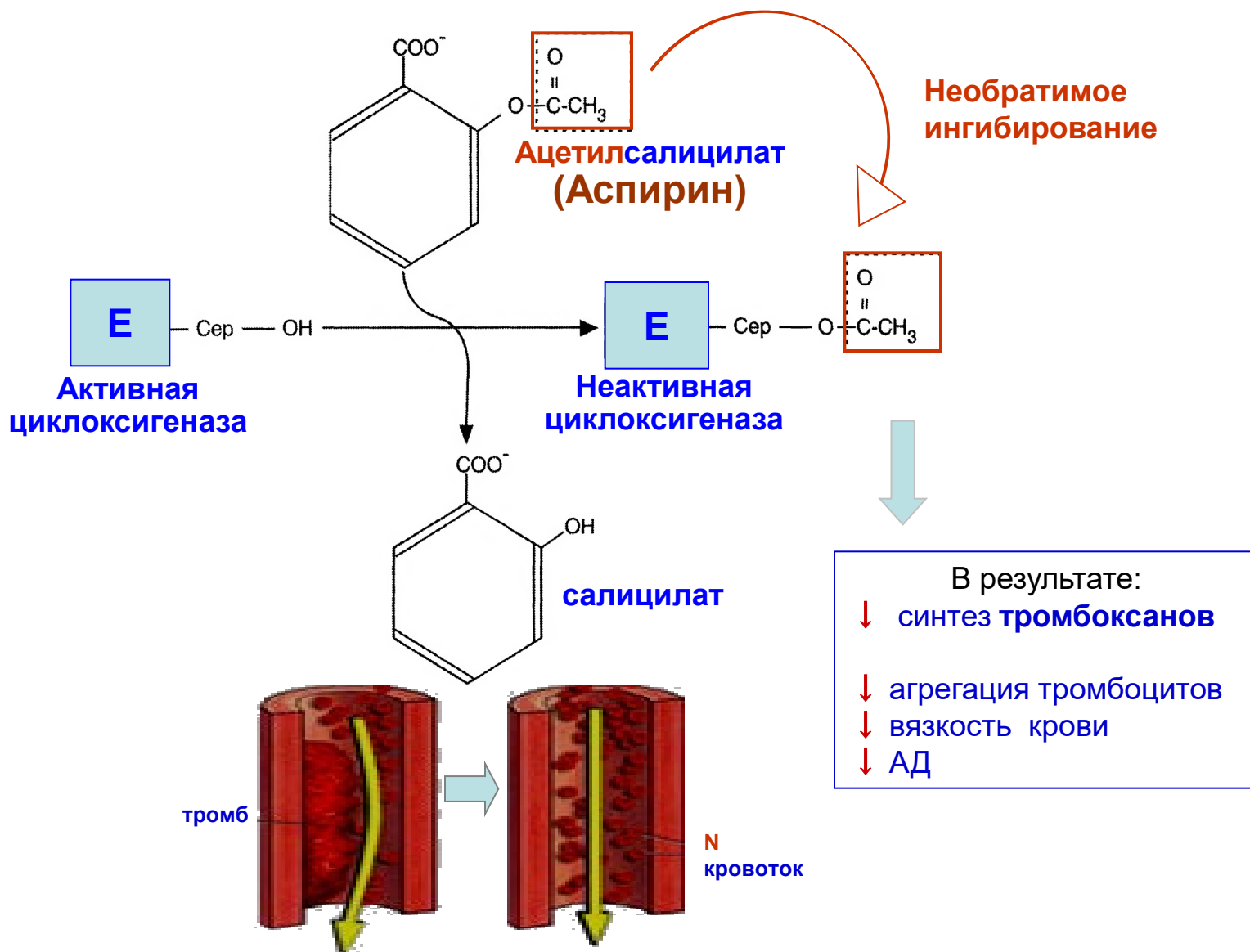


Ацетилсалициловая
кислота (аспирин)

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

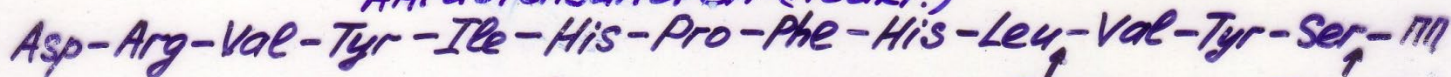


МЕХАНИЗМ ИНАКТИВАЦИИ ЦИКЛОКСИГЕНАЗЫ АСПИРИНОМ



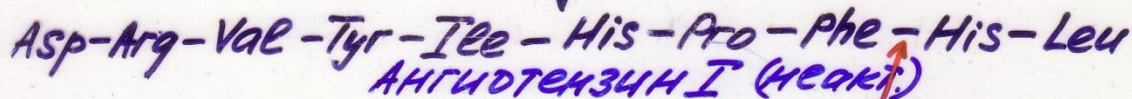
РЕГУЛЯЦИЯ КРОВЯНОГО ДАВЛЕНИЯ

АНГИОТЕНЗИНОГЕН (неакт.)



↑
ренин

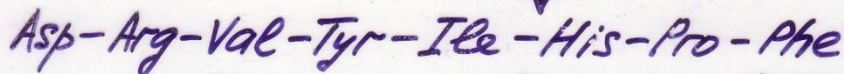
↑
трипсин



АНГИОТЕНЗИН I (неакт.)

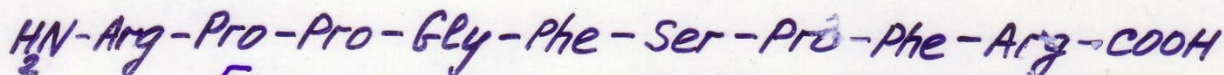
↑
АПФ

↓
АПФ



АНГИОТЕНЗИН II (акт.)

МОЩНЫЙ СТИМУЛЯТОР
КРОВ. ДАВЛЕНИЯ (ПОВЫШАЕТ)



БРАДИКИНИН

ПОНИЖАЕТ ДАВЛЕНИЕ

Ядовитая змея — южно-американская ямкоголовая
гадюка парализует жертву.

Яд ⇒ резкое понижение давления.

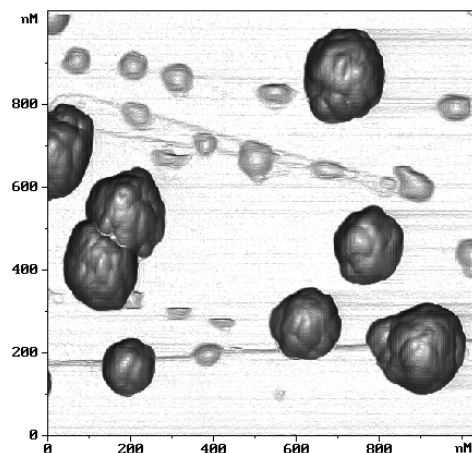
Выделяет особые пептиды, стимулирующие акт. бр.,
т.к. блокируют АПФ. и защищают бр. от инактив.

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

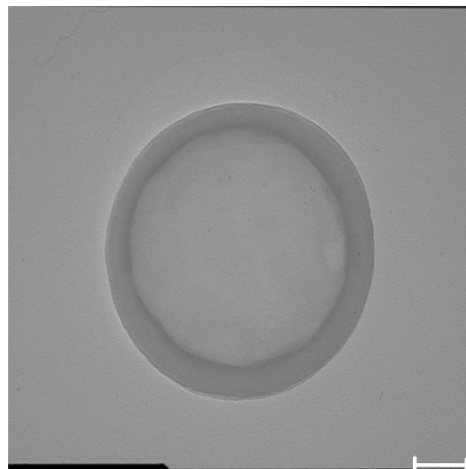


Синтезирован ряд пептидов, исп. в мед., напр.,
каптоприл. Он ингибирует АПФ ⇒ сниж. давл.

Кальций-фосфатные наночастицы для офтальмологии



Атомно-силовая микроскопия



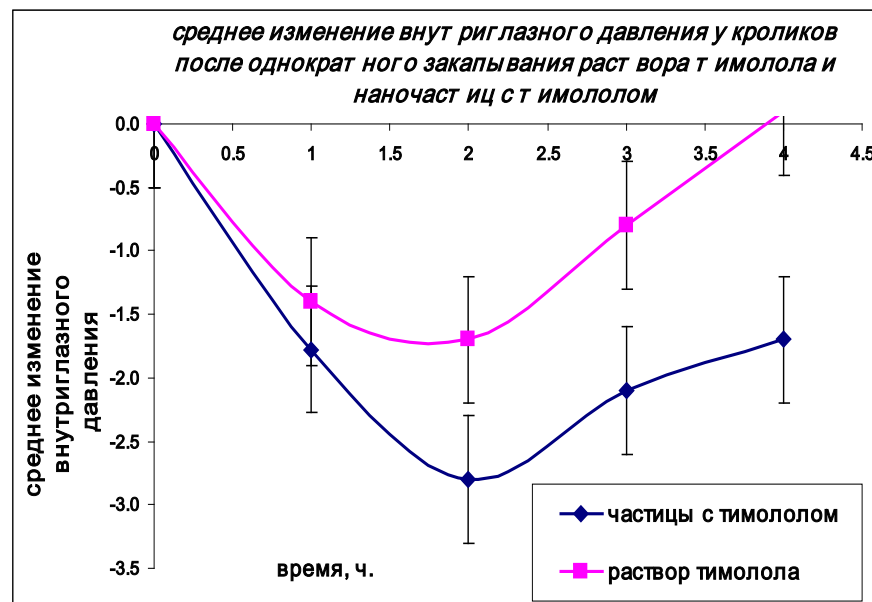
Проникающая электронная микроскопия

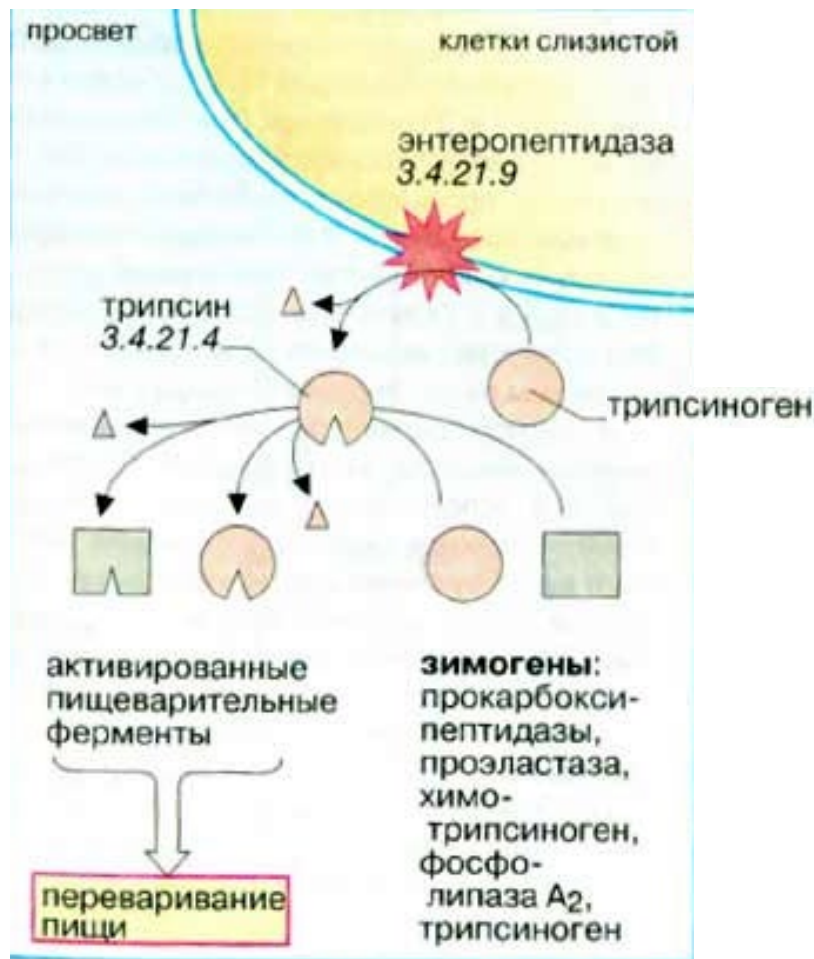


Кальций-фосфатные наночастицы – для офтальмологических лекарственных препаратов.

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.





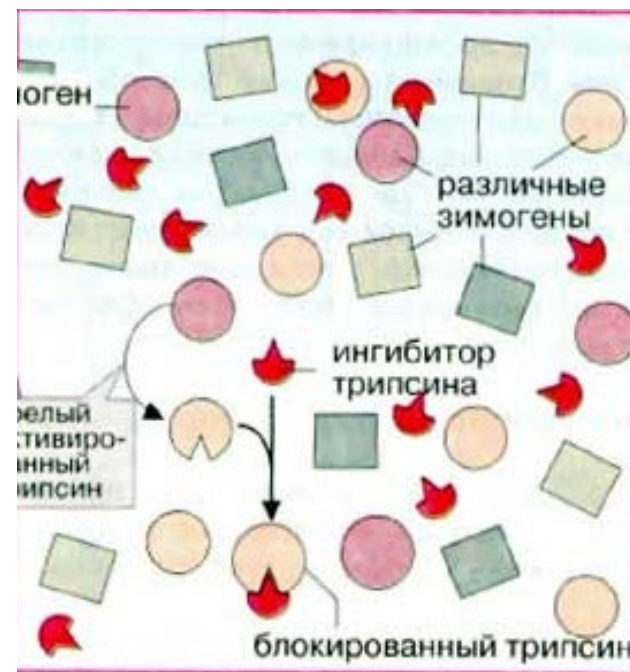
Мезим форте

Пищеварительное ферментное средство, восполняет дефицит ферментов поджелудочной железы, оказывает протеолитическое, амилалитическое и липолитическое действие. Входящие в состав панкреатические ферменты (**липаза, альфа-амилаза, трипсин, химотрипсин**) способствуют расщеплению белков до аминокислот, жиров - до глицерина и жирных кислот, крахмала - до декстринов и моносахаридов. Панкреатические ферменты высвобождаются из лекарственной формы в щелочной среде тонкого кишечника.

Тонкий кишечник

Активация пищеварительных ферментов поджелудочной железы

Секрет поджелудочной железы



РЕГУЛЯЦИЯ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

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

Ингибиторы обратимые

Конкурентные

Неконкурентные

Бесконкурентные

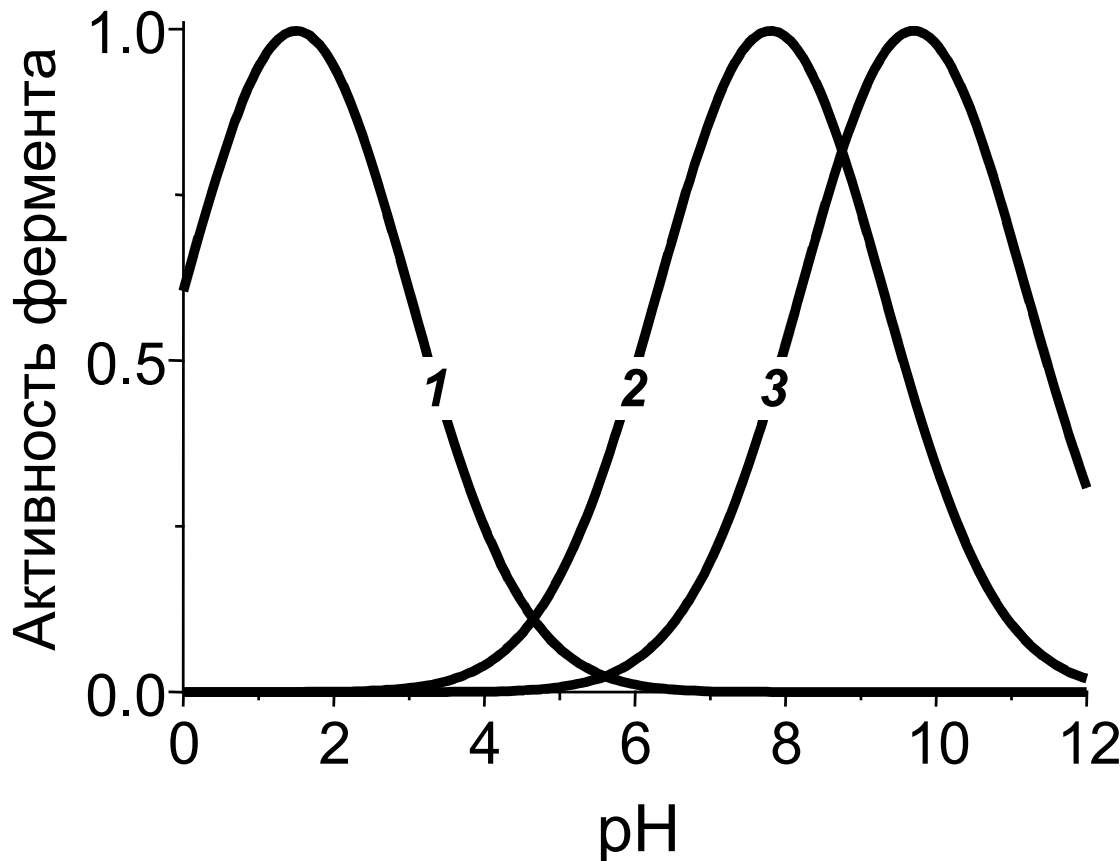
Ингибиторы необратимые

Модификаторы

Субстратоподобные
(суицидные)

Кинетика ферментативных реакций

Зависимость скорости ферментативных реакций от pH



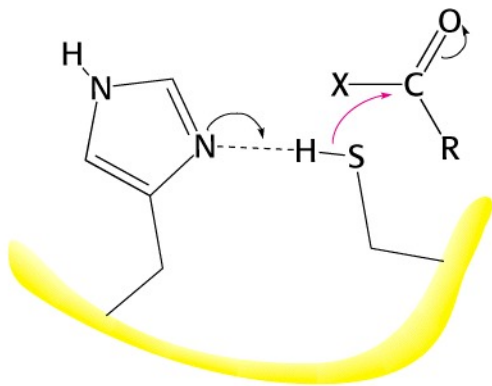
Зависимость активности ферментов (для удобства сравнения приведены активности, нормированные к единице) от pH.

1 — Пепсин,
2 — рибонуклеаза,
3 — аргиназа

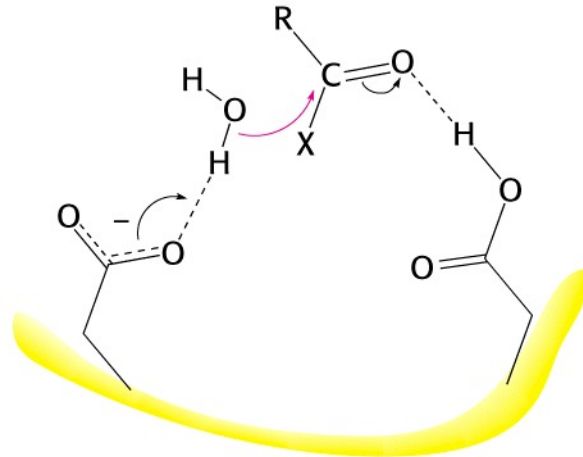
Другие классы протеаз

в активном центре карбоксильные группы двух аспарагиновых кислот

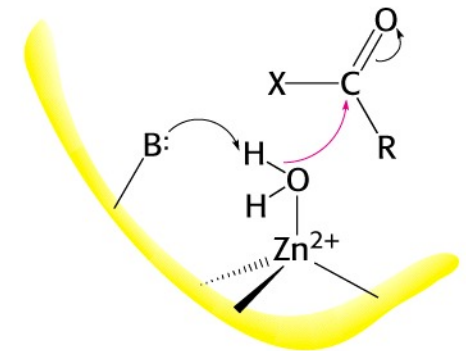
(A) CYSTEINE PROTEASES



(B) ASPARTYL PROTEASES



(C) METALLOPROTEASES



Аспартильные протеазы

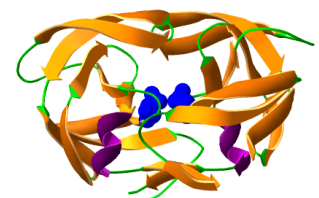
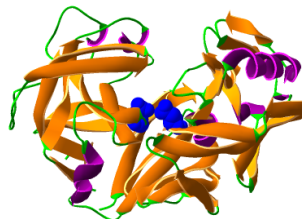
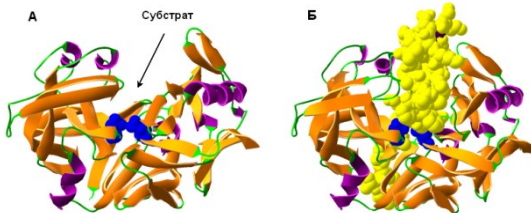
Животные, грибы, высшие растения производят семейство протеолитических ферментов, известных как аспартильные протеазы (**aspartic proteases**)

ВИЧ 1 протеаза
(гомодимер)
Asp-25 (субъединица A) и Asp-25'
(субъединица B)

Структуры **пепсина** и **пепсиногена**
свиньи

Катепсин D человека
Asp-33 и Asp-231

Химозин быка
Asp-32 и Asp-215





пепсин (EC 3.4.23.1)

Свиной пепсин первым из всех ферментов получил название (Schwann, T., 1825) и вторым из ферментов, после уреазы, был закристаллизован (Northrop, J.H., 1930).

Пепсин - первый фермент в цепи ферментов пищеварительной системы, расщепляющих белки. В активной форме локализуется в желудке млекопитающих. Кроме гидролиза белков, пепсин катализируют реакцию образования пептидной связи (обладает транспептидазной активностью).

Другие аспартильные протеазы млекопитающих: **катепсин D** (EC 3.4.23.5), **химозин** (ранее называвшийся **реннин**) (EC 3.4.23.4) и **ренин** (EC 3.4.23.23) [1, 2].

Катепсин D найден в лизосомах клеток печени и селезёнки высших эукариот и участвует в катаболизме белков клетки.

Зрелый катепсин D после посттрансляционной модификации состоит из двух цепей: легкой (остатки 1-97 первичной последовательности) и тяжелой (остатки 106-346). Содержит на N-конце фосфорилированные олигосахариды, с помощью которых через манноза-6-фосфатные рецепторы попадает в лизосомы.

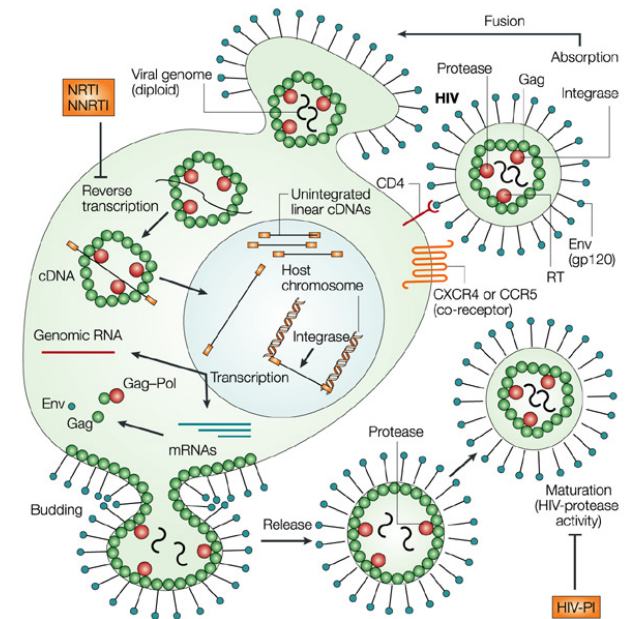
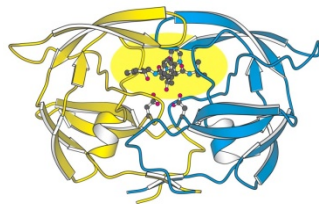
Интересен с фармакологической точки зрения, вовлечен в ряд био процессов: развитие рака груди, мышечной дистрофии, дегенеративные изменения мозга, и др. **Создание лекарств, включающих ингибиторы катепсина D – одно из направлений современной фармакологии.**



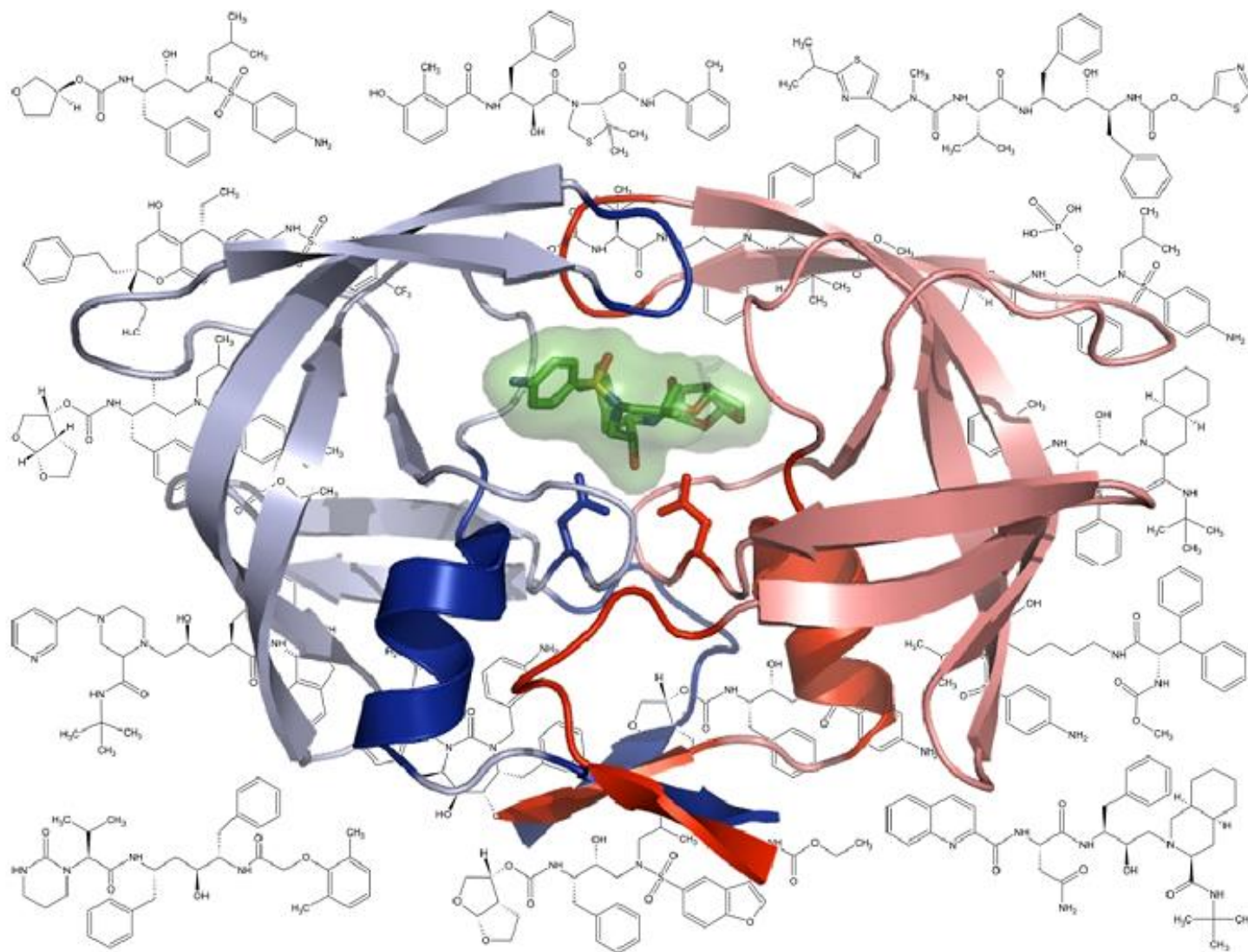
Химозин синтезируется в желудке новорожденных млекопитающих, чтобы расщеплять единственную связь Phe-105 – Met-106 только в одном из белков молока – κ -казеине. Следствием расщепления κ -казеина является сворачивание молока (на протяжении веков использовался в производстве сыров). **Химозин обладает абсолютной специфичностью.**

Ренин участвует в регуляции кровяного давления – **отщепляет декапептид ангиотензин I** от N-конца прогормона ангиотензиногена и обладает слабой общей протеиназной активностью. Изучение ингибиторов ренина были направлено на разработку лекарств против повышенного давления (антигипертензивных лекарств).

Новая аспартильная протеаза: ретровирусная протеаза вируса иммунодефицита человека (ЕС 3.4.23.16) – **HIV протеаза**. Потеря активности ВИЧ протеаз приводит к тому, что вирус не реплицируется в CD_4 Т – лимфоцитах, то есть становится неинфекционным. Поэтому, **разработка всё более эффективных ингибиторов ВИЧ-протеаз является одним из перспективных направлений в терапии СПИДа**



ВИЧ-1 протеаза с ингибиторами



Нобелевская премия 2016 (физиология и медицина)

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

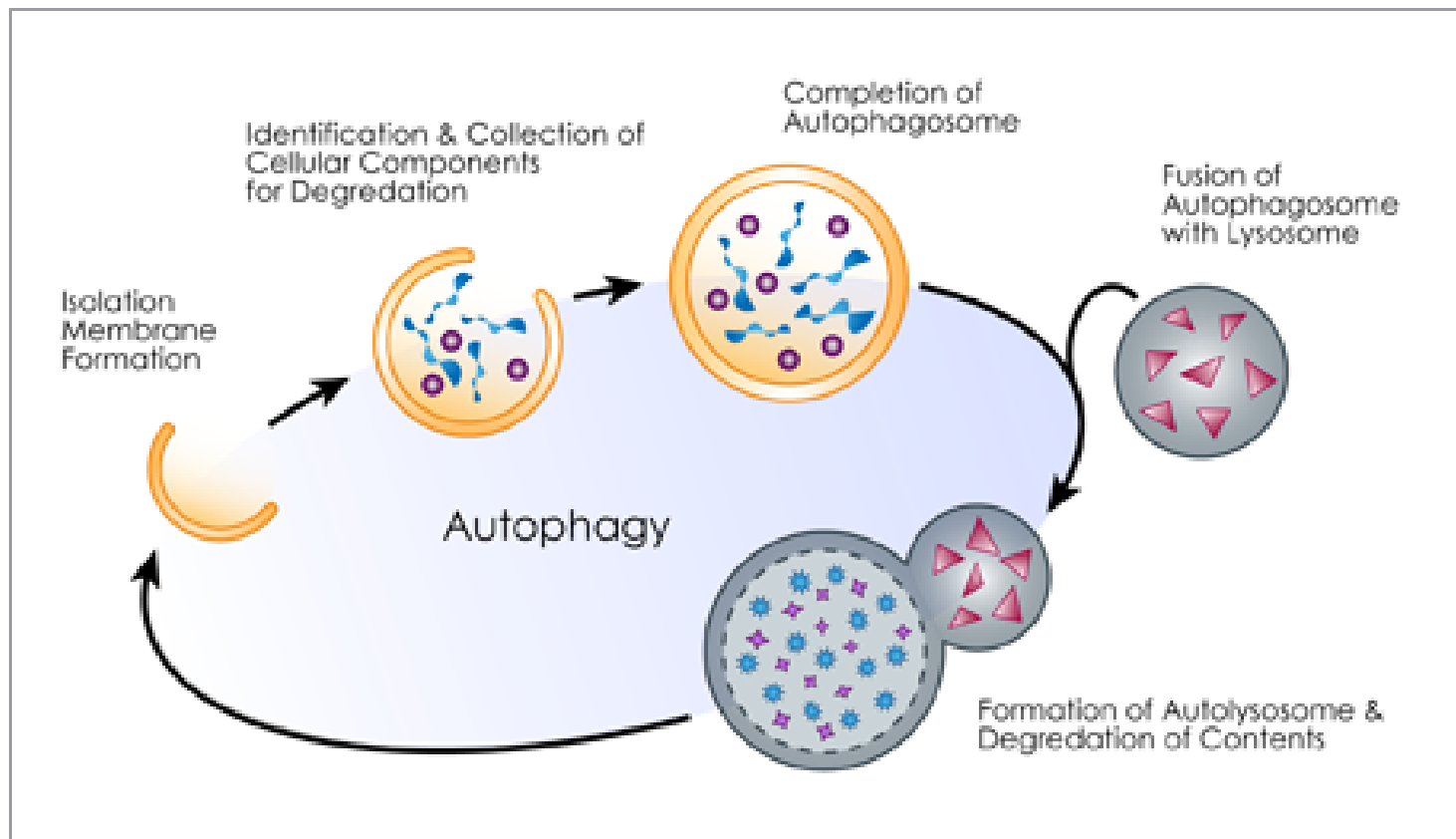
Макроавтофагия – основной путь для уничтожения поврежденных клеточных органелл и ненужных белков.

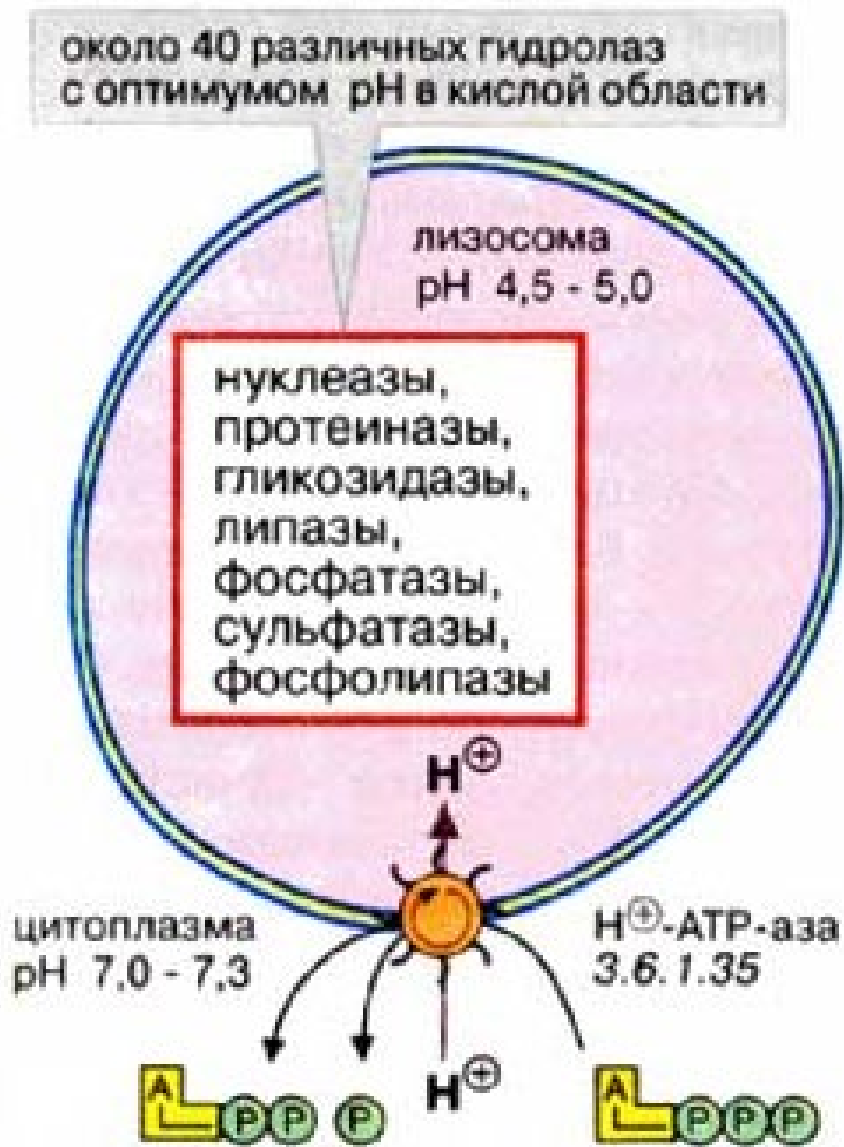
Образование двойной мембраны – автофагосомы вокруг органеллы.

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.

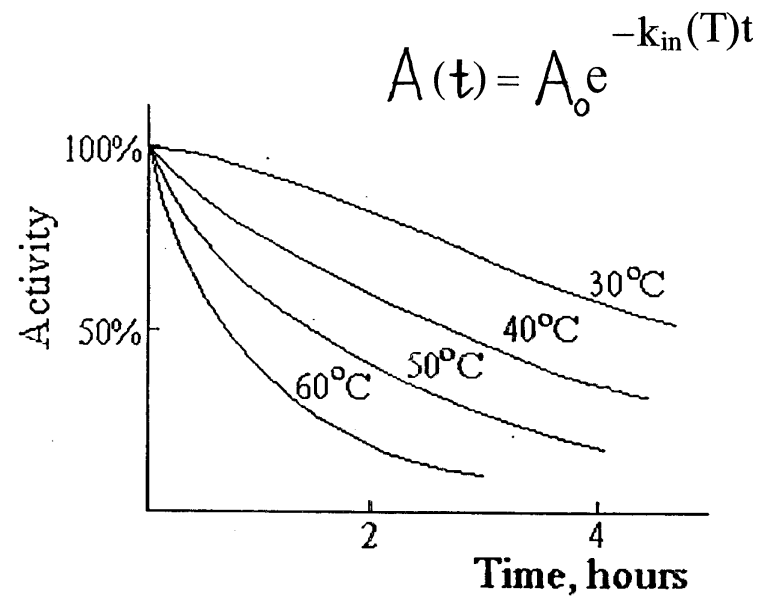
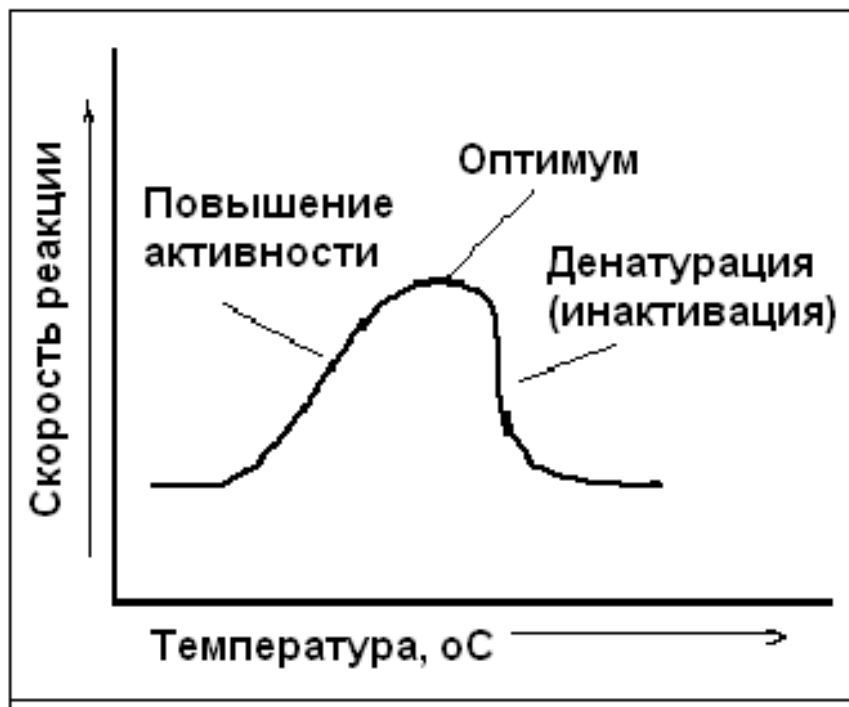
Несколько сотен лизосом на клетку.

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*.

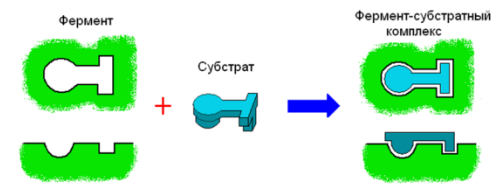
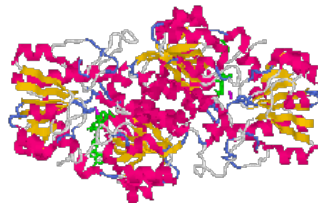
АТФ-зависимые протонные насосы в мембране обогащают лизосомы протонами, pH 4,5-5,0 (в то время как в цитоплазме pH 7,0-7,3).

ТЕМПЕРАТУРА ВЛИЯЕТ НА РАБОТУ ФЕРМЕНТА

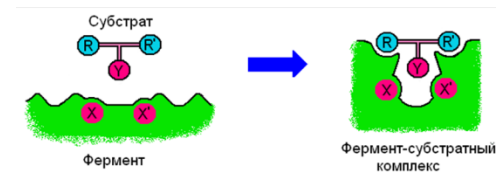


Факторы, определяющие каталитическую эффективность ферментов

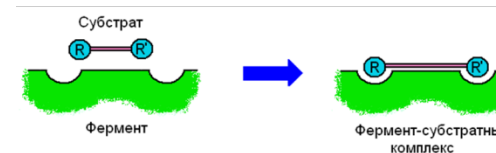
- Сближение и ориентация (внутримолекулярный режим реакции)
- Напряжение и деформация; индуцированное соответствие
- Общий кислотно-основной катализ; Ковалентный катализ
- Эффекты микросреды



Ключ – замок
(Фишер)



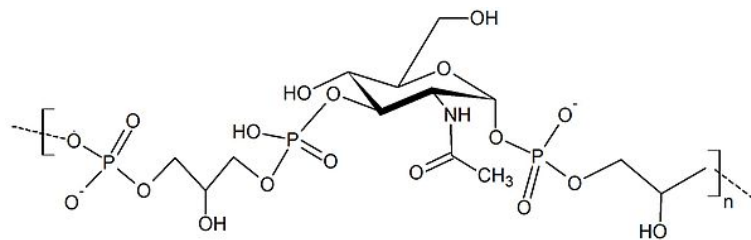
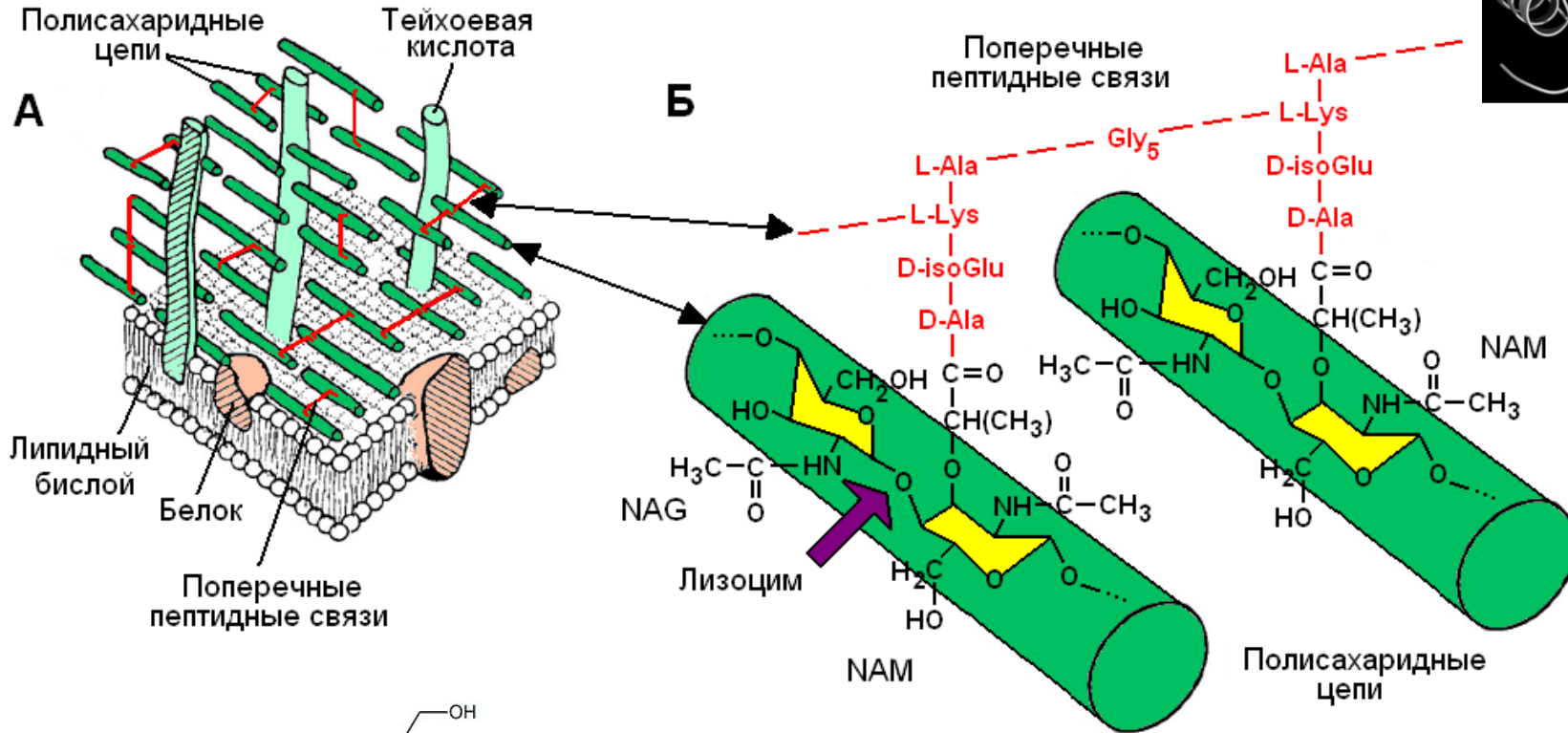
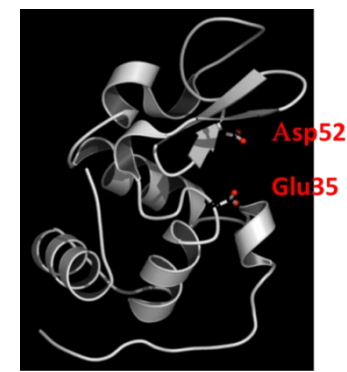
Механизм индуцированного соответствия
(Кошланд)



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

ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА - СВЯЗЫВАНИЕ С КОФЕРМЕНТОМ ВЫЗЫВАЕТ КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ

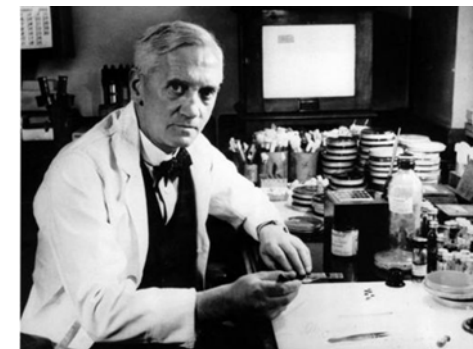
ЛИЗОЦИМ БЕЛКА КУРИНОГО ЯЙЦА – ГИДРОЛИЗ ПОЛИСАХАРИДНОГО ОСТОВА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ БАКТЕРИЙ

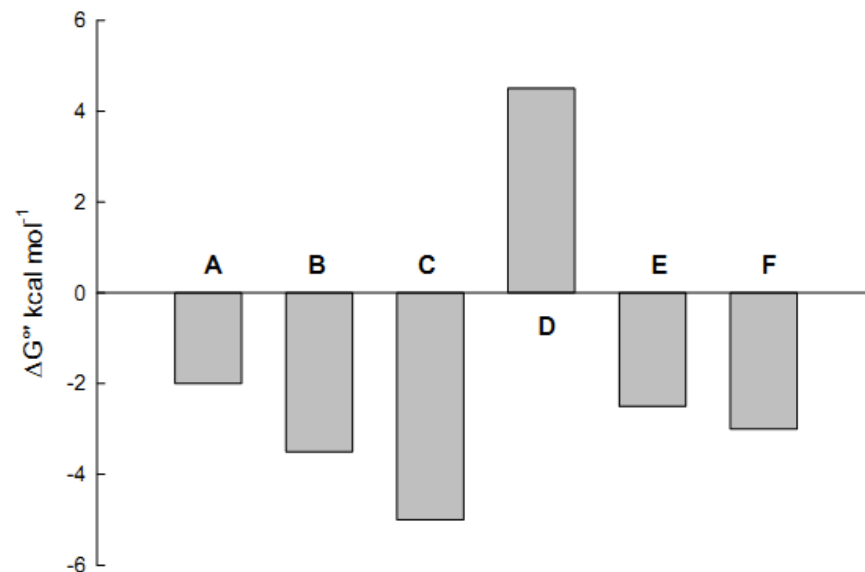
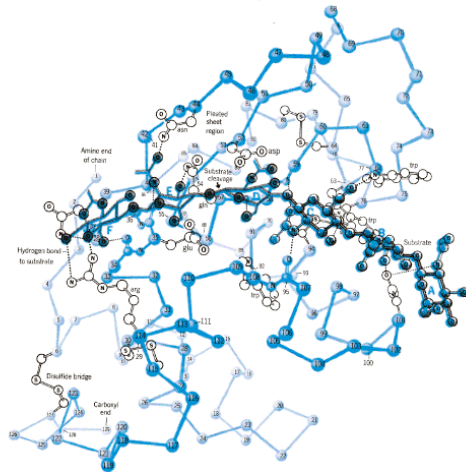


Структура тейхоевой кислоты
клеточной стенки [Micrococcaceae](#)

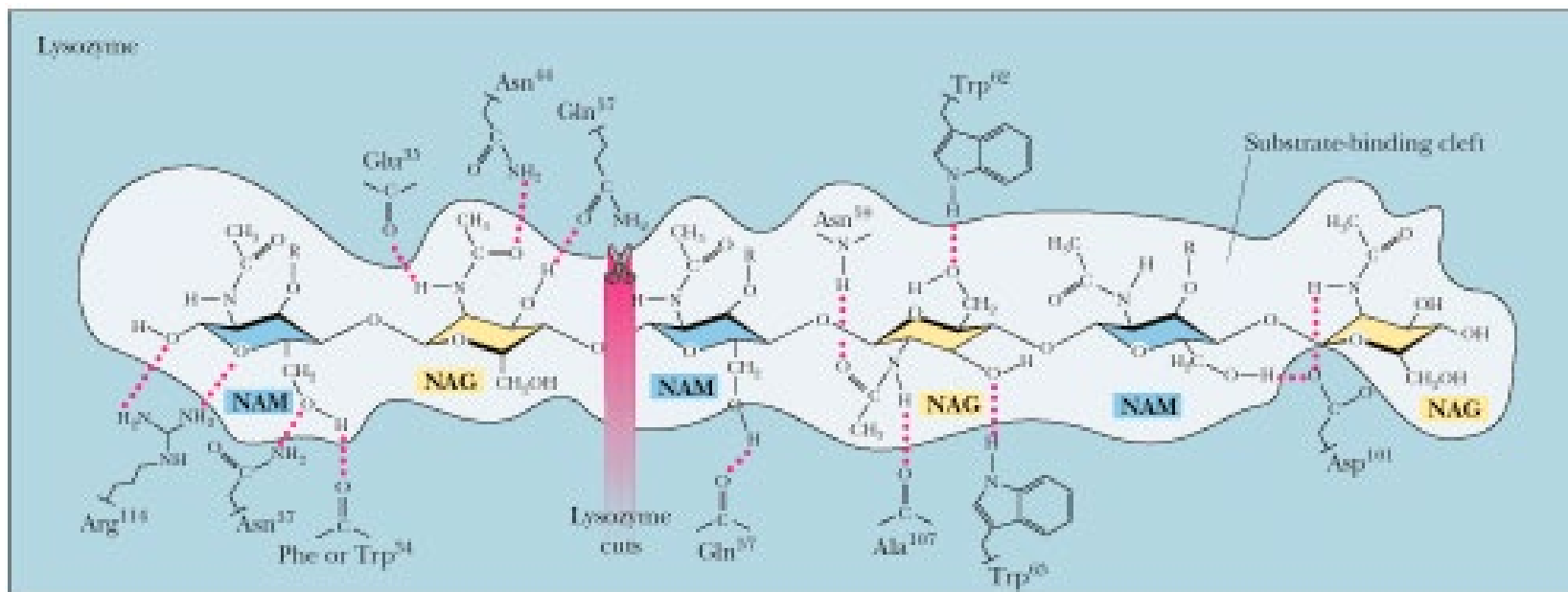
Случайно открыт
Флемингом в 1922

1 полипептидная цепь,
14.3кДа, 4 S-S мостика, 1-я
трехмерная структура (1965г)
D. Phillips (x-ray crystallography)

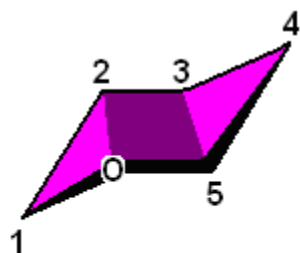




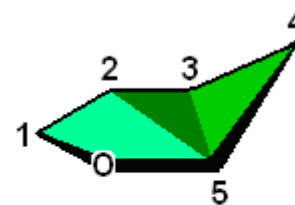
ЛИЗОЦИМ: **многоточечное** **взаимодействие субстрата и** **фермента**



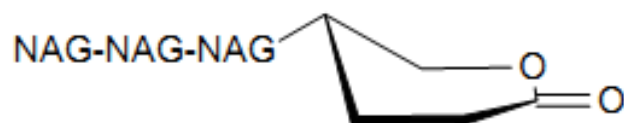
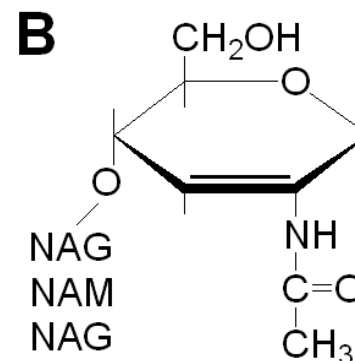
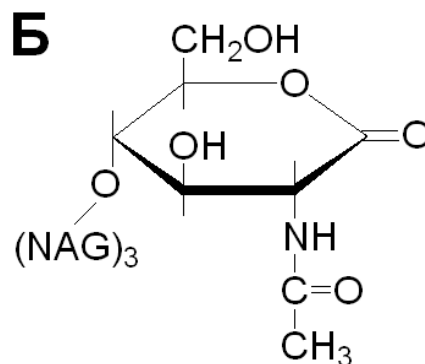
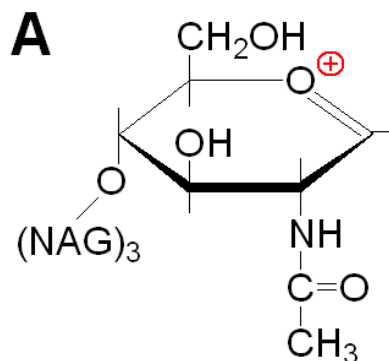
АНАЛОГИ ПЕРЕХОДНОГО СОСТОЯНИЯ СВЯЗЫВАЮТСЯ С ФЕРМЕНТОМ ЛУЧШЕ



Конформация кресла



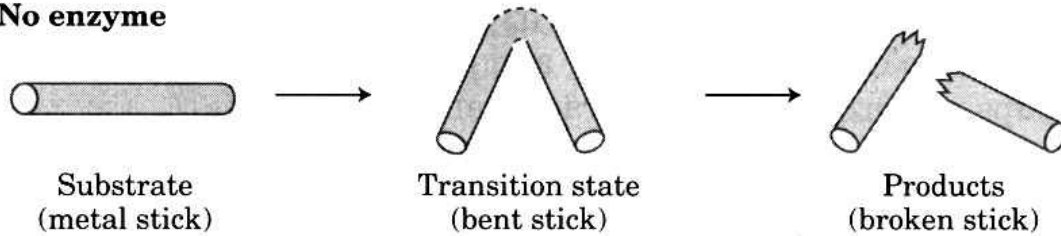
Конформация полукресла



Связывается в 3600 раз лучше в активном центре, чем NAG4

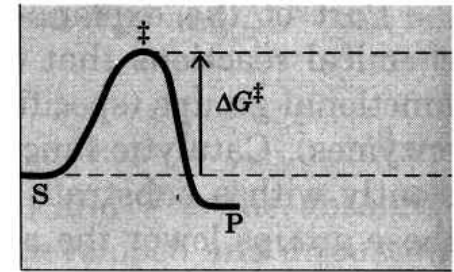
Предпочтительно связывание в переходном состоянии?

No enzyme

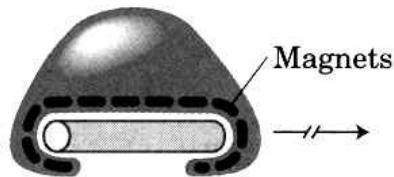


(a)

Free energy, G

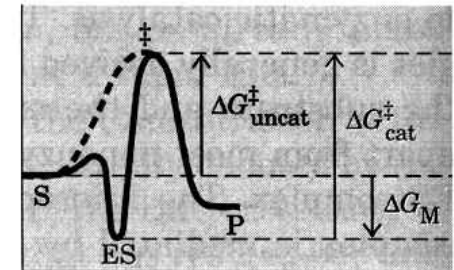


Enzyme complementary to substrate

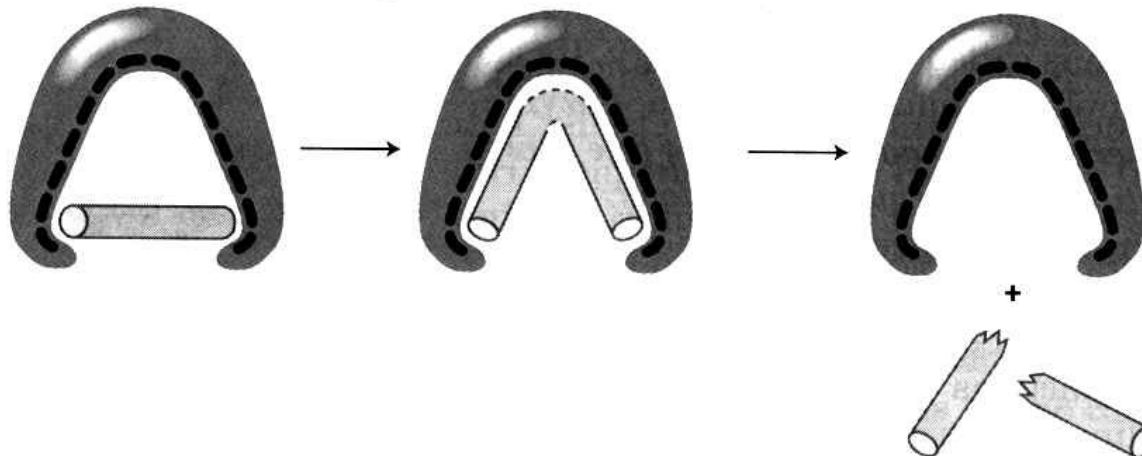


(b)

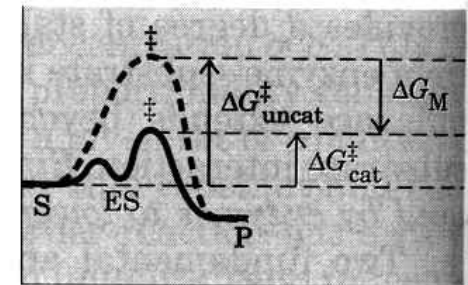
Free energy, G



Enzyme complementary to transition state

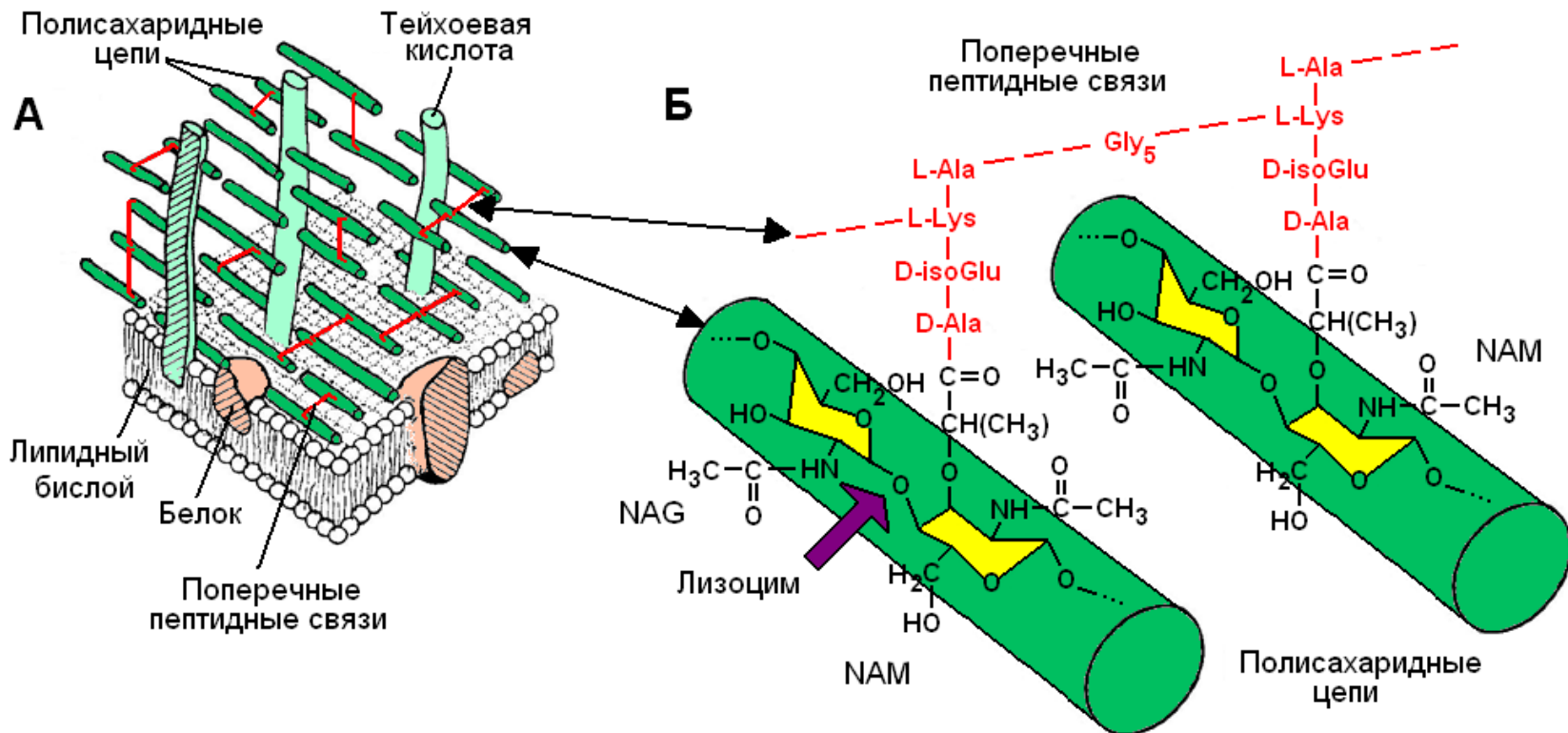


Free energy, G



Reaction coordinate

КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА БАКТЕРИЙ



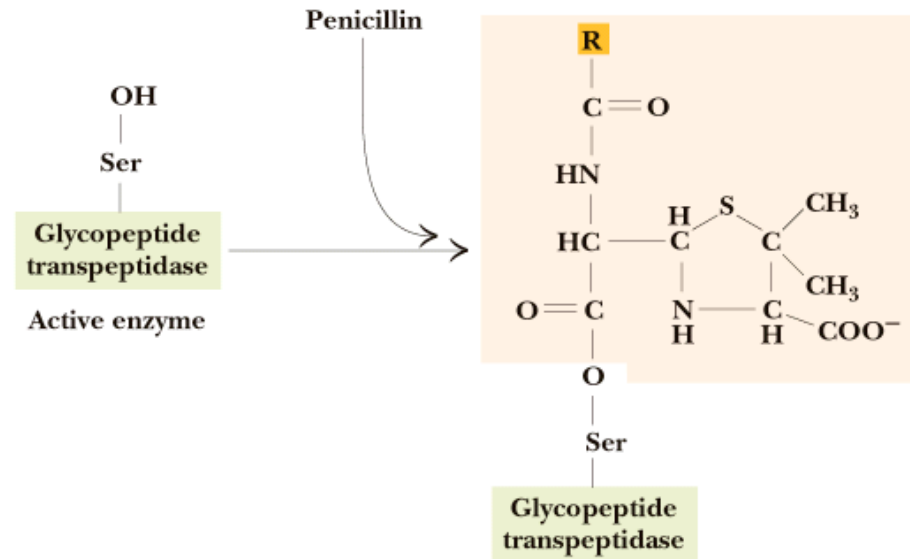
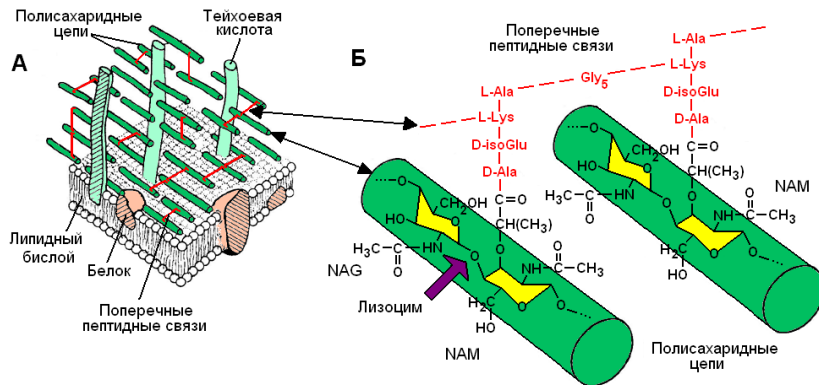
Флеминг (1928) открыл химиотерапевтическую активность пенициллина (роль в борьбе с инфекцией во время второй мировой войны).

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.

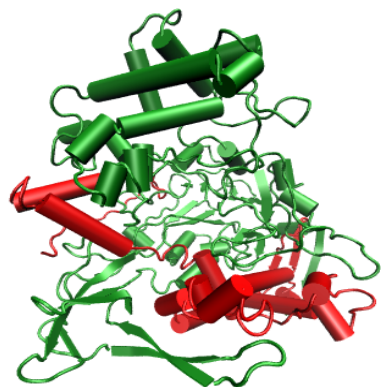
Пенициллины, в частности, нарушают процесс образования клеточной стенки бактерий.

ПЕНИЦИЛЛИН НЕОБРАТИМО ИНГИБИРУЕТ ФЕРМЕНТ, «УПРОЧНЯЮЩИЙ» КЛЕТОЧНУЮ СТЕНКУ БАКТЕРИЙ

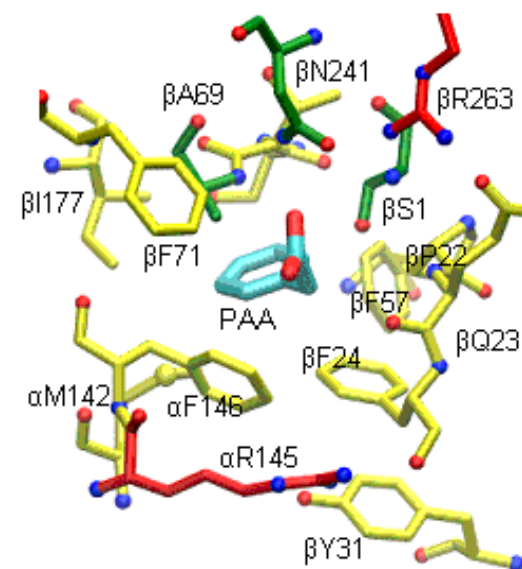
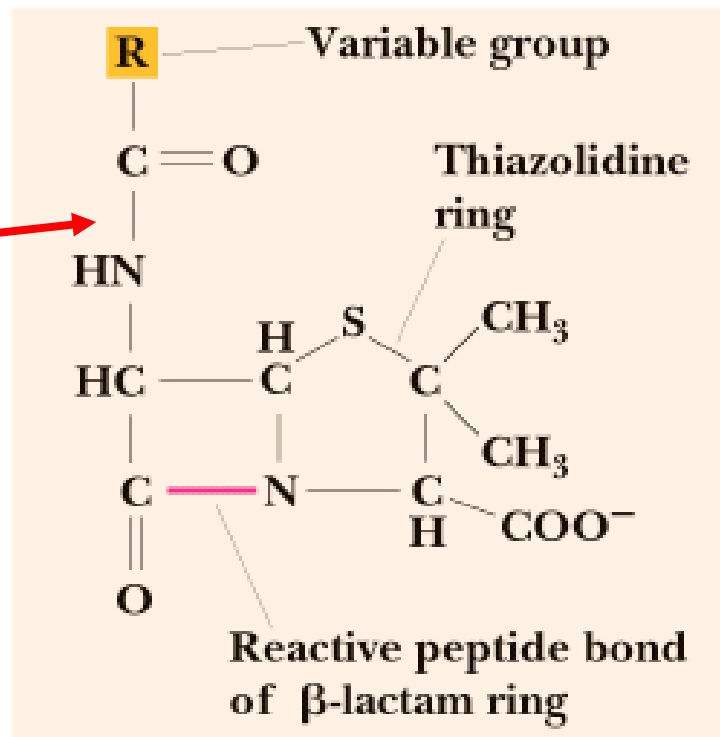


**Penicilloyl-enzyme complex
(enzymatically inactive)**

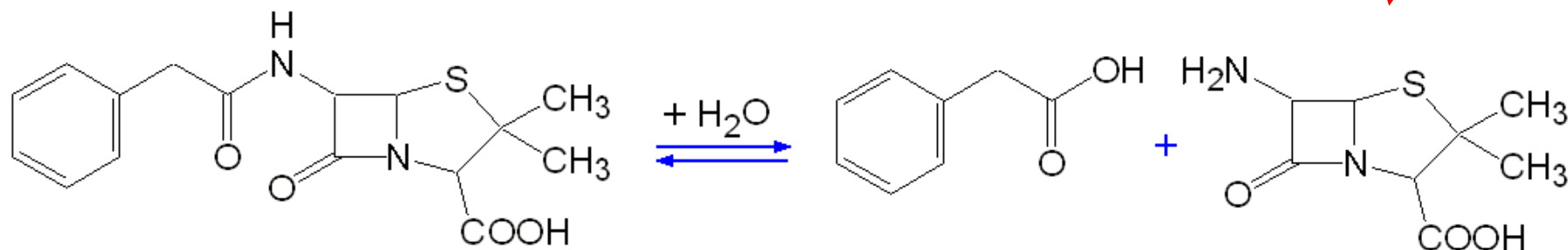
ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗА

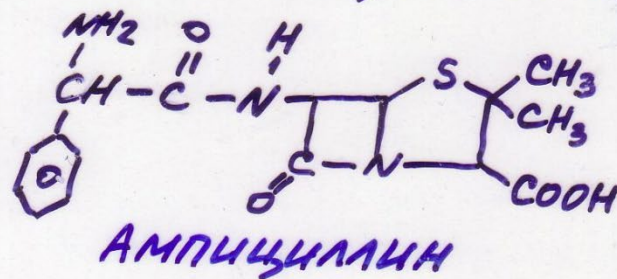
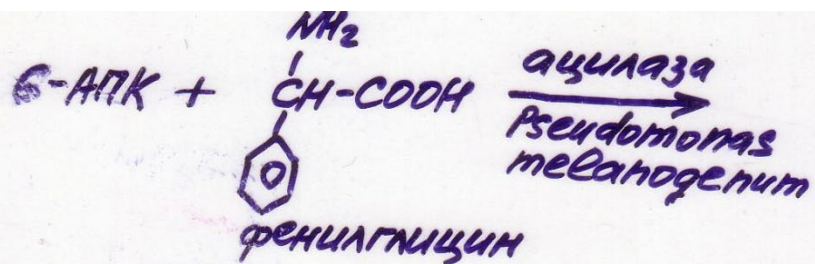


Пенициллинацилаза



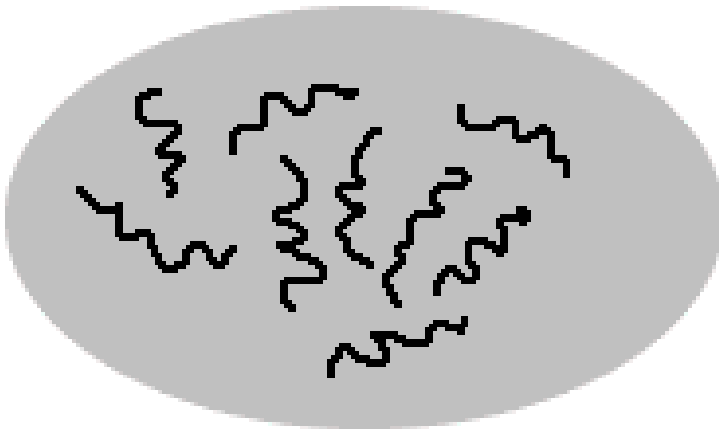
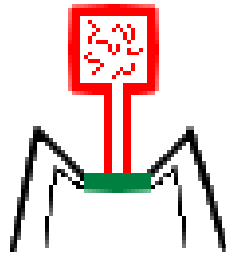
6-АПК – полупродукт в синтезе антибиотиков



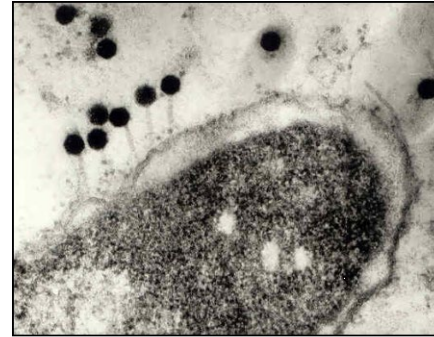


Бактериофаги (фаги) – вирусы, способные инфицировать бактерии

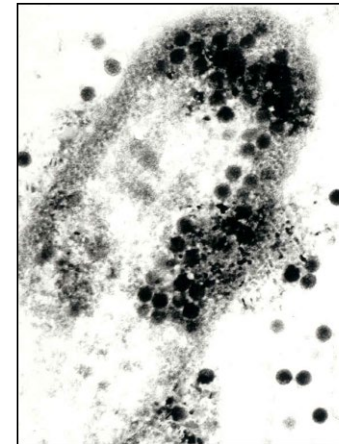
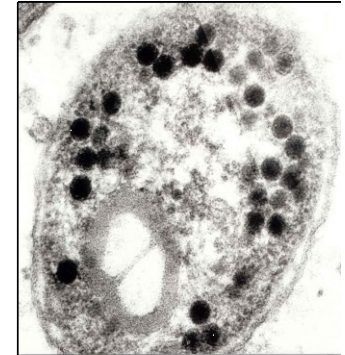
Отличаются от вирусов животных и растений



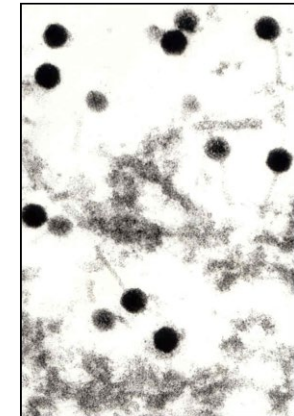
20 min



30 min



60 min

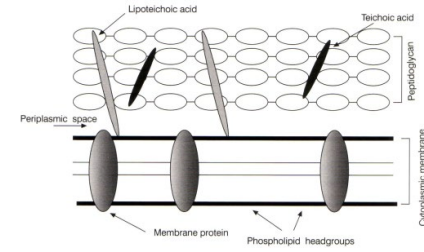


120 min

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) может 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:

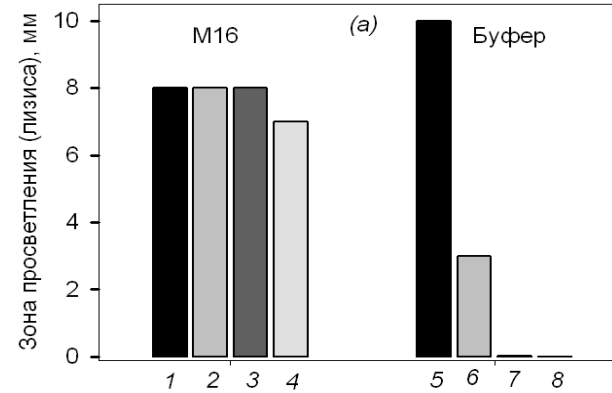
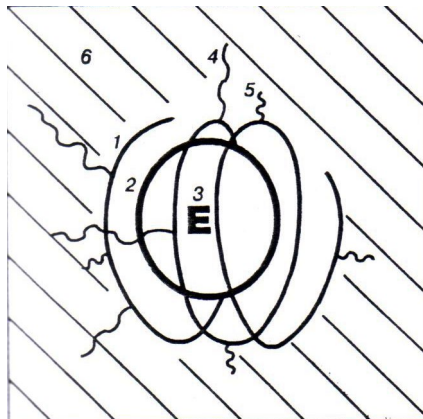
Чувствительность к T очень высока (низкая стабильность):

4°C - месяцы

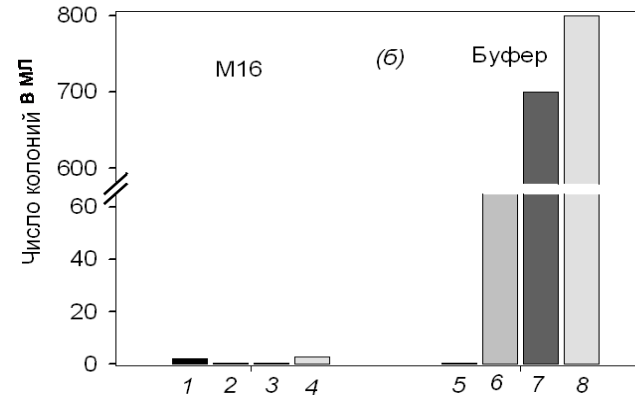
20°C - часы

37°C - минуты

Мицеллярно-полимерная композиция защищает фермент



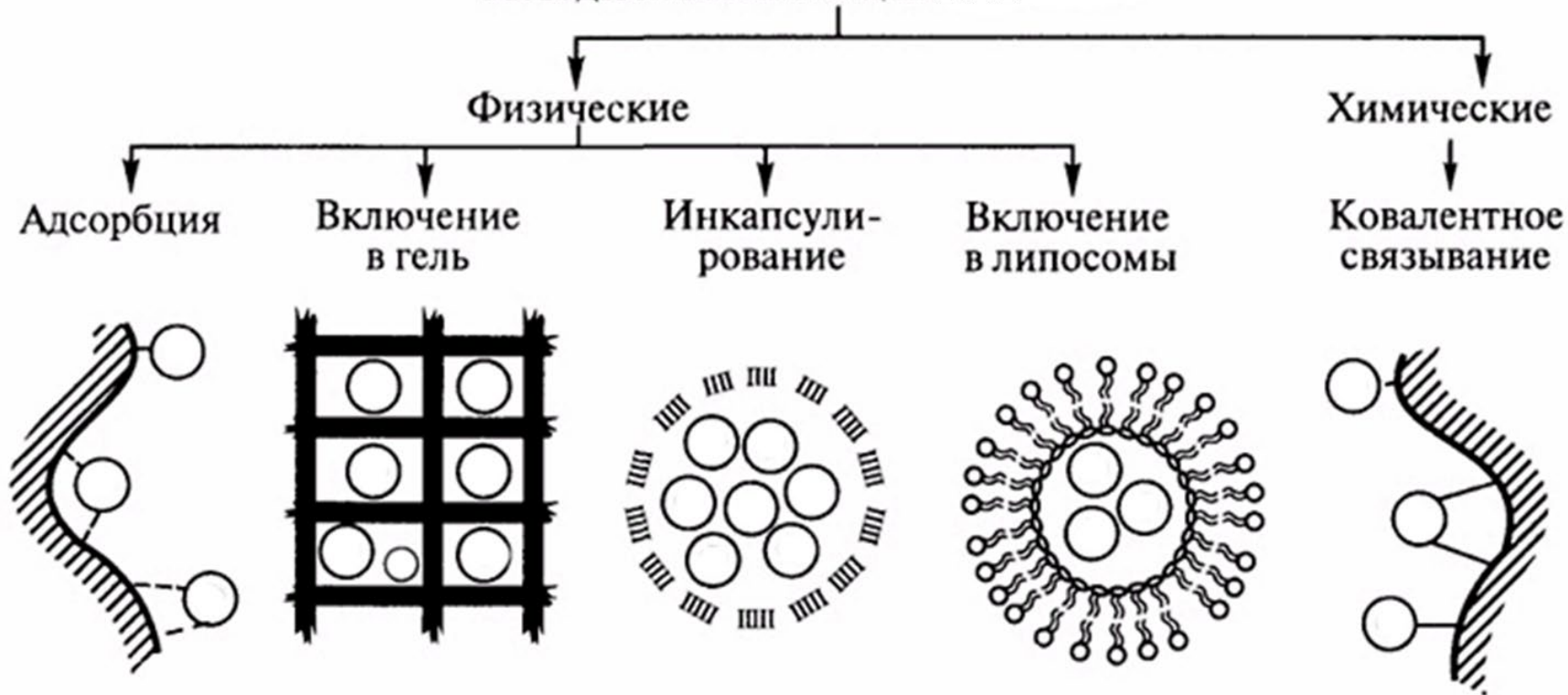
Снижение эффективности



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).

Методы иммобилизации БАВ



Преимущества иммобилизованных ферментов

- **ТЕХНОЛОГИЧНОСТЬ**
- **ПРОСТОТА МАНИПУЛЯЦИЙ**
- **ПОВЫШЕННАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ**
(ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ ПРИ ХРАНЕНИИ)

Недостатки иммобилизованных ферментов

- **ПОНИЖЕННАЯ КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ**
- **ИЗМЕНЕННАЯ СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧЕОСТЬ**
- **ДИФФУЗИОННЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ**

Источники ферментов для технологии:

Животные

Rennet (Abomasum) – производство сыра

Химотрипсин, трипсин – выделка кожи

Растения

Амилазы (Malted barley) – сбраживание

Папаин (Papain latex) – мясо

Микроорганизмы

α -амилаза (Bacillus) – крахмал

Глюкозоизомераза (Bacillus) – фруктовые сиропы

Протеаза (Bacillus) – стиральные порошки

Грибы

Глюкоамилаза (Aspergillus) – крахмал

Пектиназа (Aspergillus) – соки, вина

Лактаза (Aspergillus) – молочные продукты

Rennet (Mucor miehei) - сыр

Дрожжи

Инвертаза (Saccharomyces) – кондитерские изделия

Инженерная энзимология

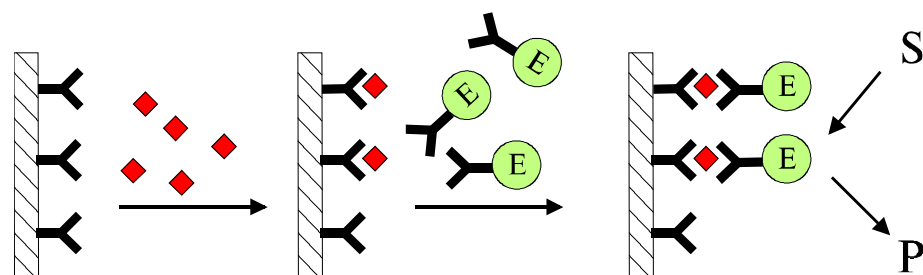
- **Тонкий органический синтез (фармацевтическое производство)**
- **Ферменты в пищевой промышленности**
 - пищевые добавки
 - производство продуктов питания
 - кормовые добавки
- **Ферменты в медицине**
 - Лекарственные препараты на основе ферментов
 - диагностические наборы и устройства
- **Аналитические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

ФЕРМЕНТЫ В АНАЛИЗЕ

- Высокая чувствительность
- Высокая селективность

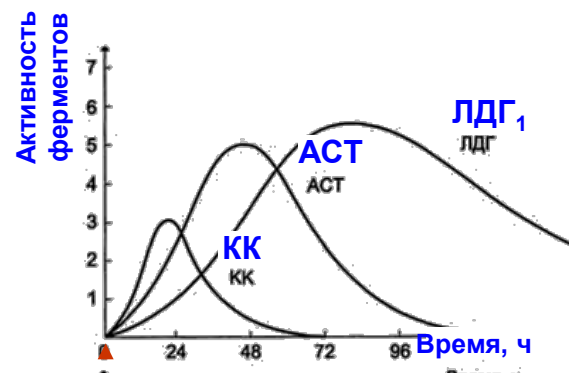
Примеры

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



СЭНДВИЧ ИФА

АСТ (AST) аспартатаминотрансфераза

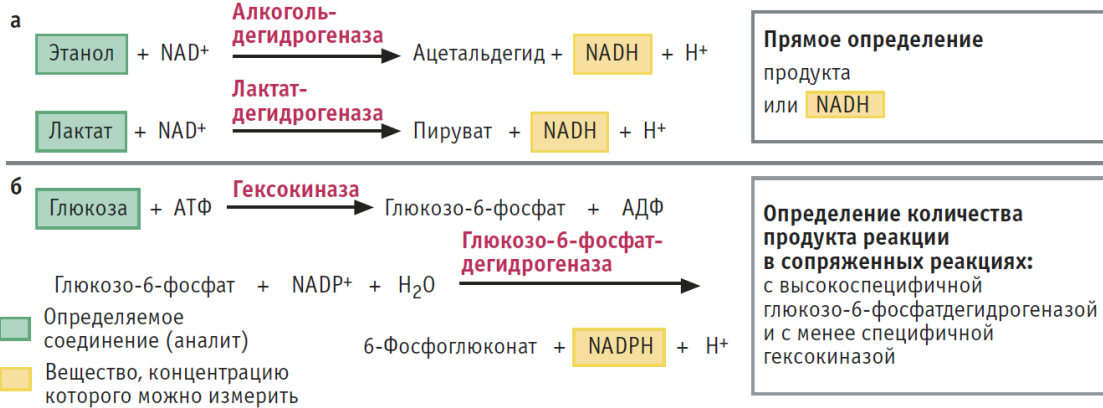


Инфаркт
миокарда

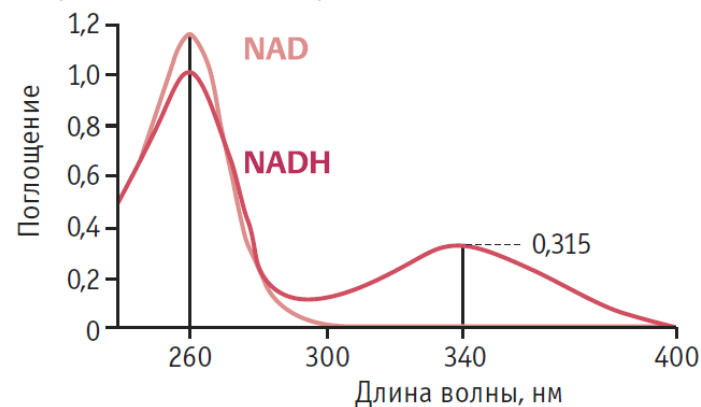
Ферменты, применяемые при проведении лабораторных клинических анализов

Фермент	ЕС-номер	Анализируемое вещество	Детектируемое вещество
Алкогольдегидрогеназа	1.1.1.1.	Этанол, другие спирты, альдегиды	NADH
Глюкозооксидаза	1.1.3.4.	Глюкоза	Окраска
Пируваткиназа	2.7.1.40	Фосфоенолпируват, АДФ	
Креатинкиназа	3.5.3.3.	Креатинин	
Цитратлиаза	4.1.2.6.	Лимонная кислота	NAD+
Маннозо-6-фосфатизомераза	5.3.1.8.	Манноза	
Сукцинил-КоА-синтетаза	6.2.1.4.	Сукцинат	

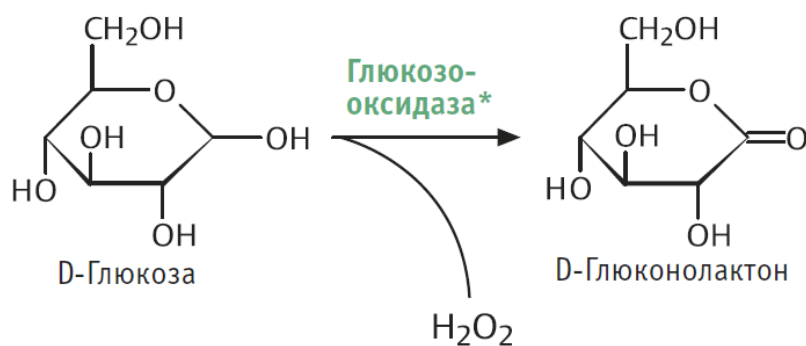
Определение концентрации субстрата по количеству продукта реакции



Определение концентрации NADH



Тест-полоски (тест на глюкозу крови)



Вещество,
окрашивающееся
при окислении

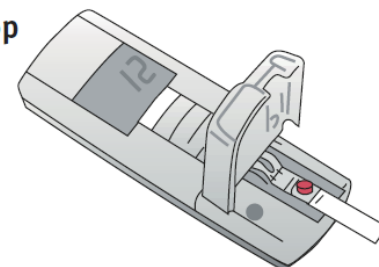
Пероксидаза**

Окрашенное
вещество

* Глюкозооксидаза *Aspergillus niger*

** Пероксидаза хрена

Портативный прибор
для определения
уровня глюкозы
крови



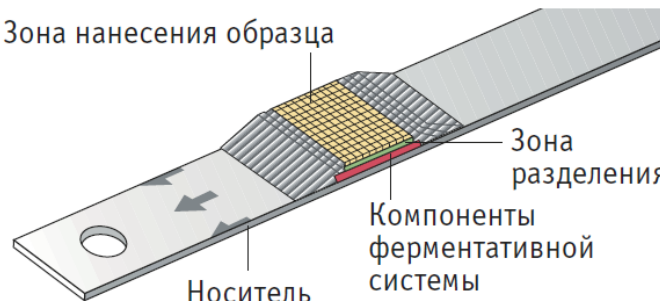
Тест-полоска

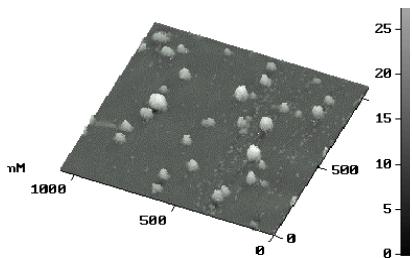
Зона нанесения образца

Зона
разделения

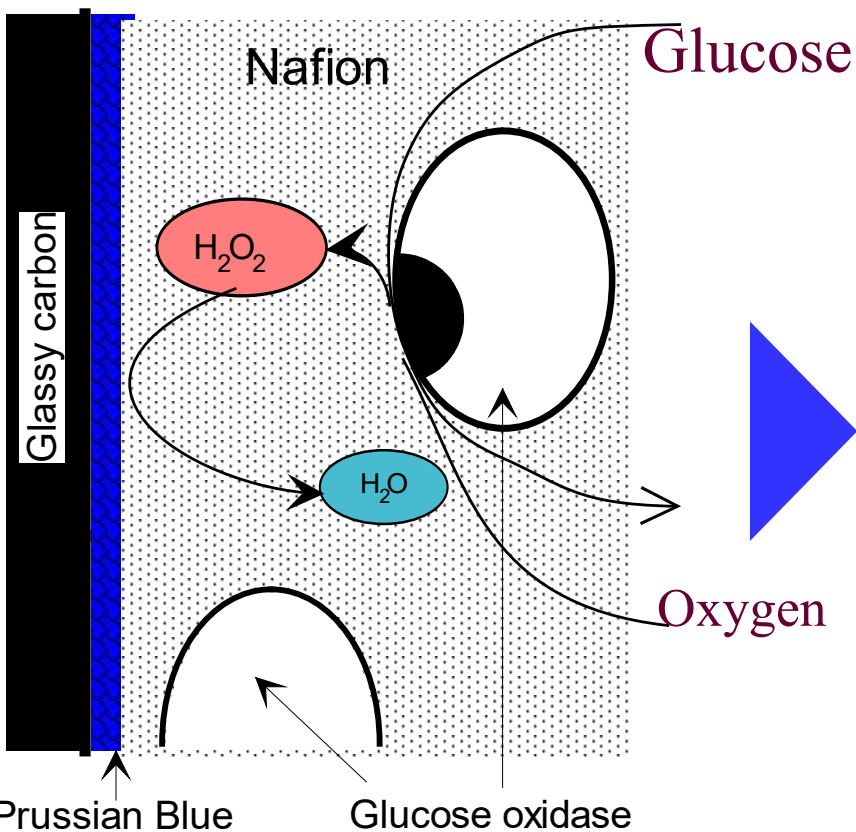
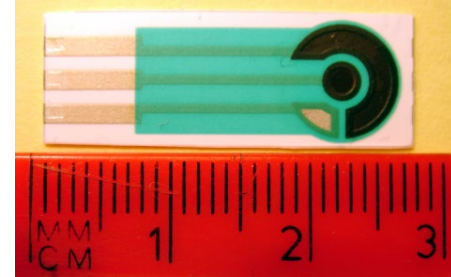
Компоненты
ферментативной
системы

Носитель





Биосенсоры, основанные на электрокатализе (наноструктурированные поверхности)

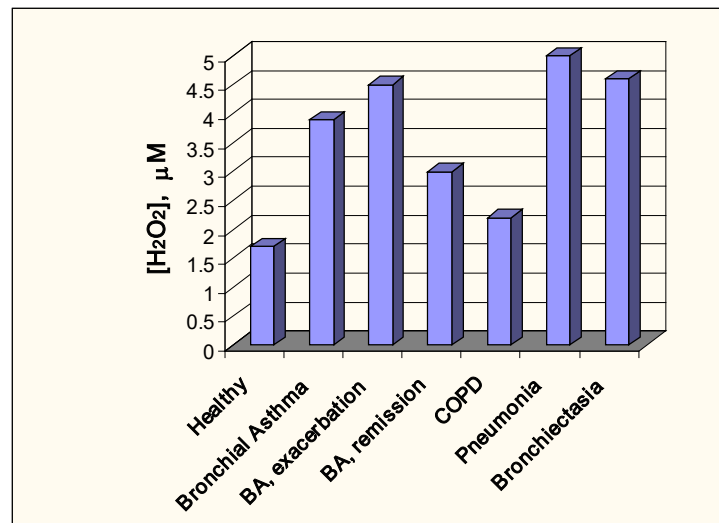


Non-invasive

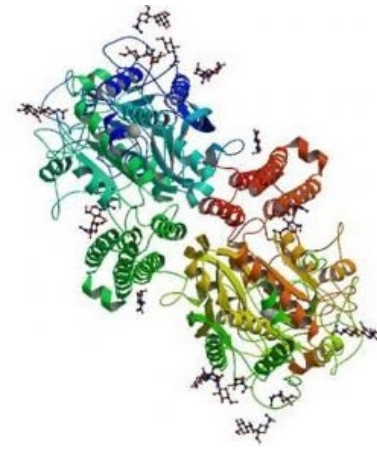
Lactate in sweat



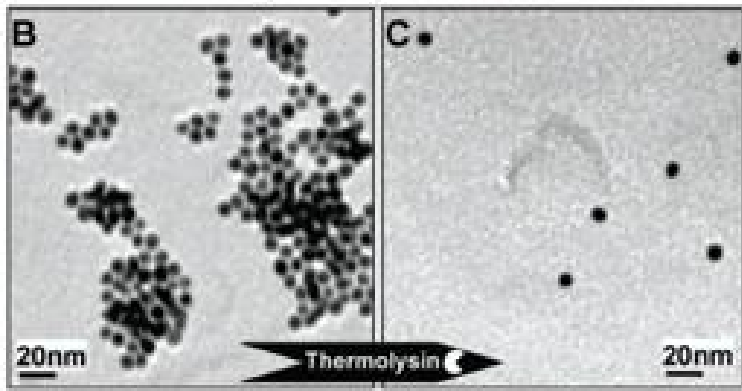
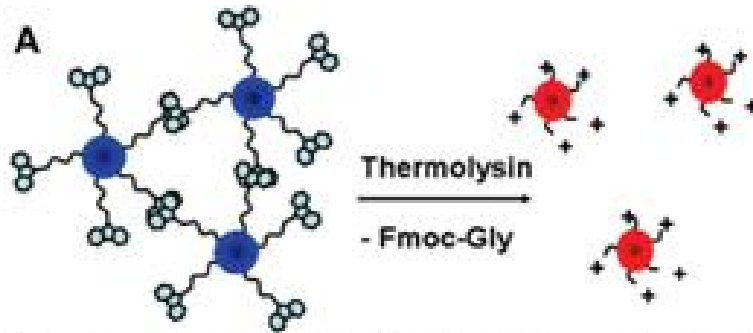
Hydrogen peroxide in EBC



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

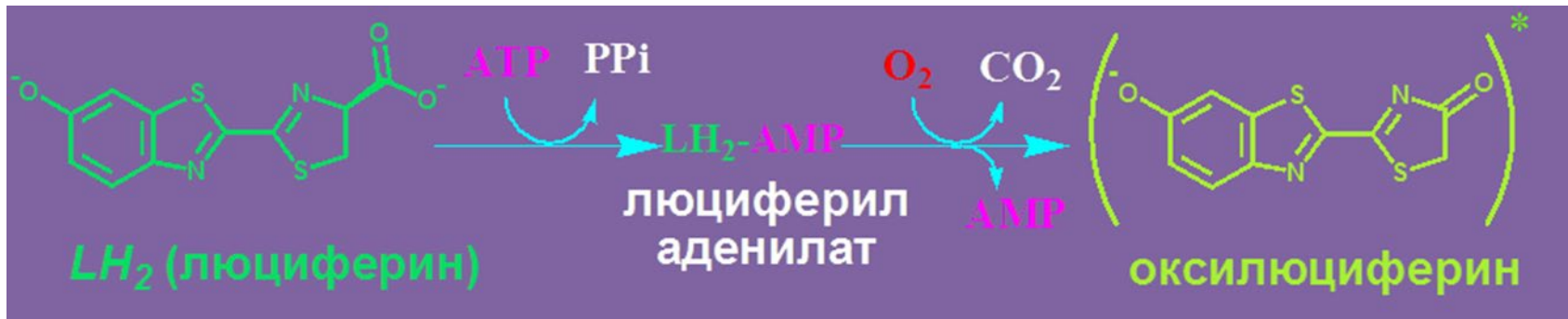
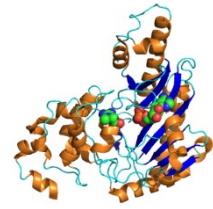
Присутствие спец фермента **пАКТ-PSA** при раке простаты – «разрываются» пептидные связи между частицами – **красная окраска**

non-alpha1-antichymotrypsin-complexed
prostate-specific antigen

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



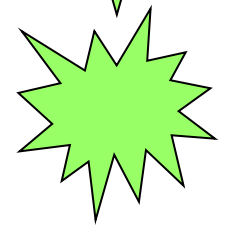
Биолюминесцентная реакция, катализируемая люциферазами светляков



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



Лауреаты нобелевской премии по химии 2018 года.

Слева направо: Фрэнсис Арнольд (Frances H. Arnold), Джордж Смит (George P. Smith) и Грег Уинтер (Sir Gregory P. Winter)

Половина премии досталась американской исследовательнице **Фрэнсис Арнольд «за направленную эволюцию ферментов»**, вторую половину поровну поделили американец **Джордж Смит и Грег Уинтер** из Великобритании — **«за фаговый дисплей пептидов и антител»**.

Все авторы связаны с разработкой методов для получения полезных для человека белков и пептидов, основанных на имитации естественного «метода» биологической эволюции, а именно — на сочетании случайной изменчивости и неслучайного отбора.

Фрэнсис Арнольд получила свой первый «неестественный» (non-natural) фермент в 1993 году (K. Chen, F. H. Arnold, 1993. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide). Тогда был получен новый **вариант фермента субтилизина E**, который катализирует расщепление и образование пептидных связей (соединений между аминокислотами в пептидных цепочках), причем, благодаря методу направленной эволюции и внесению в исходно взятый природный белок **10 аминокислотных замен**, удалось заставить фермент **работать в органическом растворителе (60% диметилформамиде)** и повысить термостабильность на 18 градусов.

Белки – настраиваемые «кирпичики»

Мутантные белки

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

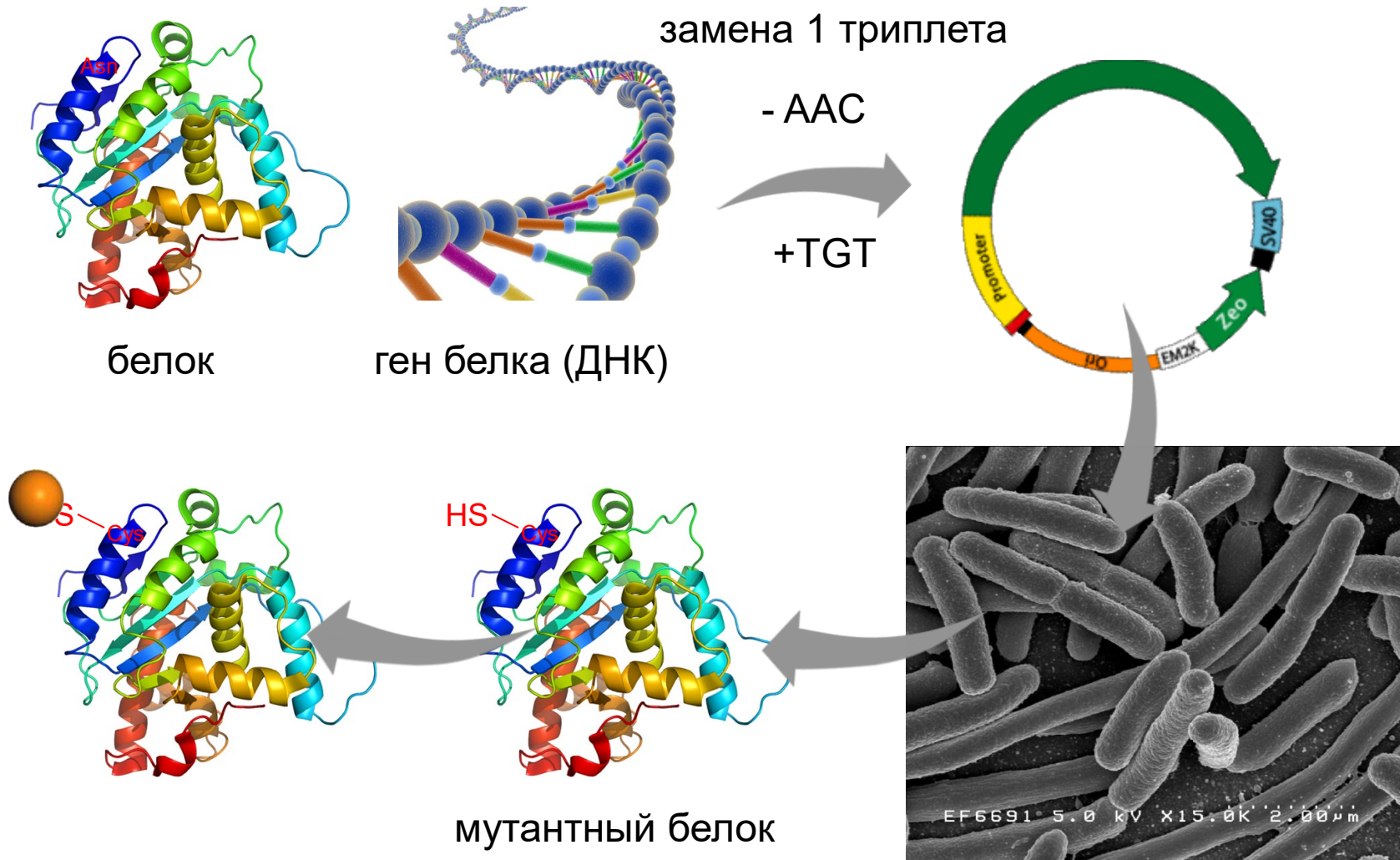
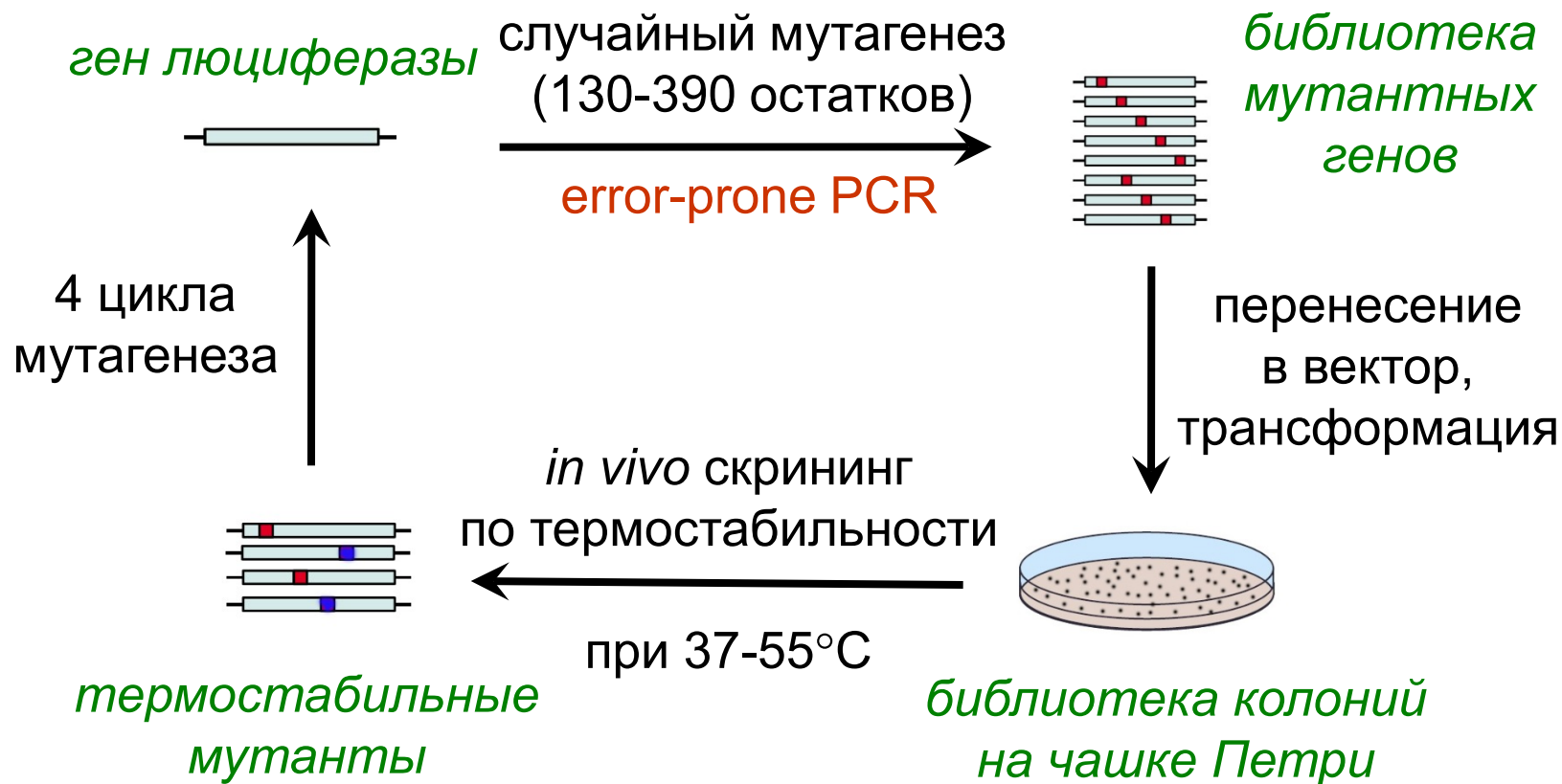
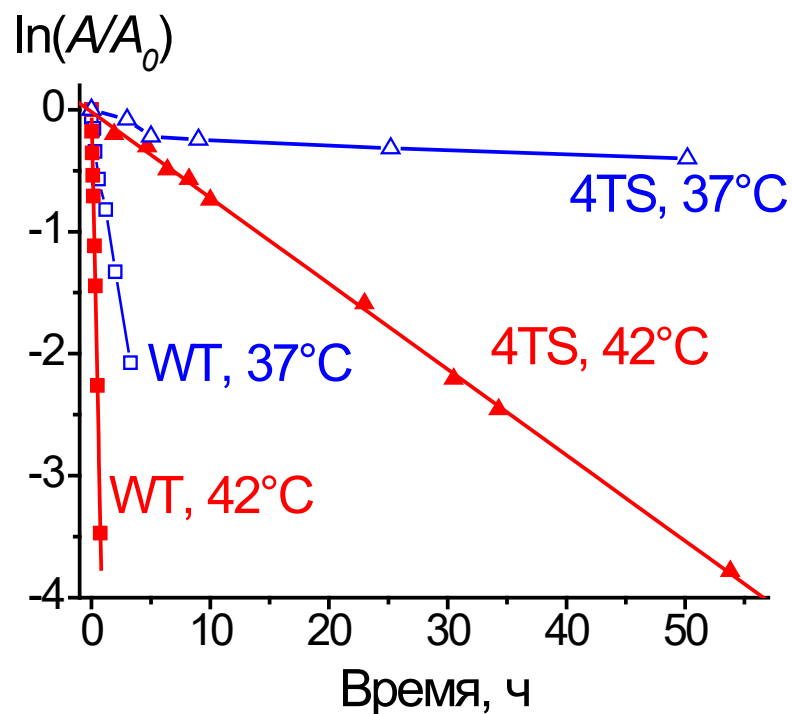
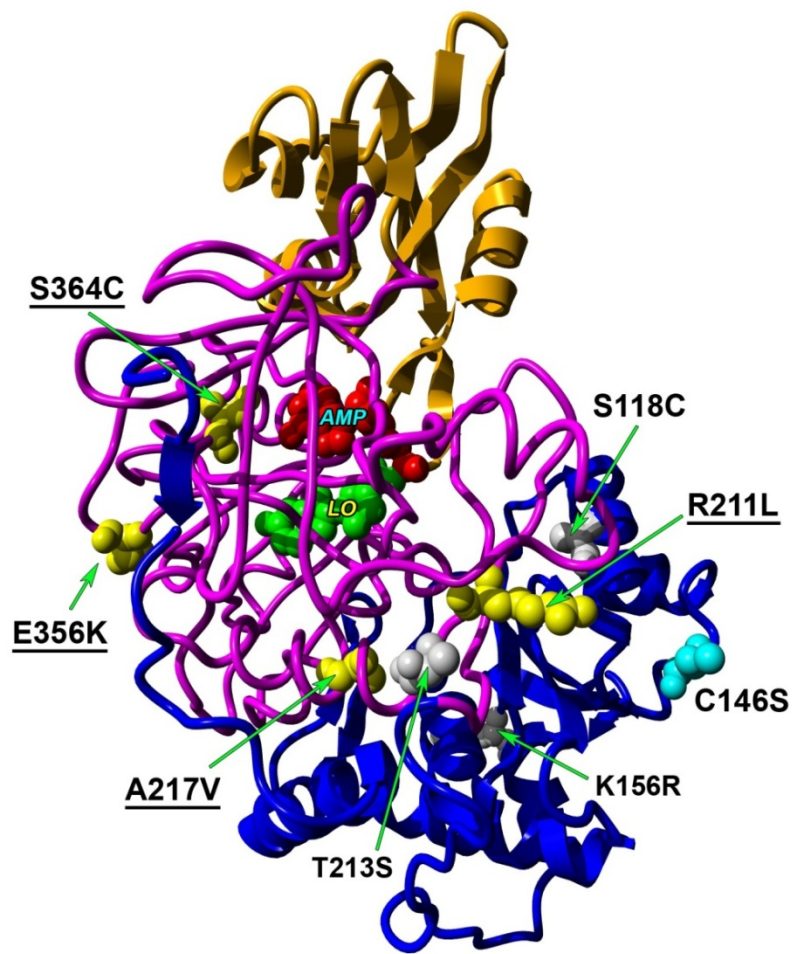


Схема повышения термостабильности люциферазы методом случайного мутагенеза



Расположение замен мутанта 4TS в структуре люциферазы и термостабильность ферментов

R211L (Arg211Leu), A217V (Ala217Val), E366K (Glu366Lys), S364C (Ser364Cys)

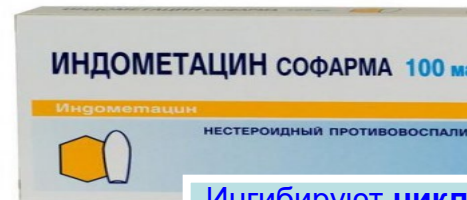


Ферменты в медицине

- Ингибиторы и активаторы ферментов как лекарственные препараты
 - Ферменты как лекарственные препараты
 - Медицинская диагностика
-
- **Энзимотерапия** – использование в лечебных целях **ферментов** и **лекарственных веществ**, влияющих на их активность
 - В лечебных целях применяют **ферменты**, **коферменты** (витамины, микроэлементы), **активаторы** (например, гормоны) и **ингибиторы ферментов** (лекарственные вещества, (например, сульфаниламиды, аспирин)); **антибиотики** – ингибирующие синтез **фермента**



Содержат комплекс ферментов поджелудочной железы: **липаза, амилаза, протеазы**



Ингибируют **циклоксигеназу**, снижая синтез простагландинов, обуславливающих в очаге воспаления развитие боли, $\uparrow t^0$, $\uparrow$ тканевой проницаемости



Сульфаметаксозол – конкурентно ингибирует биосинтез **фолиевой кислоты** и образование ТГФК, оказывая бактерицидное действие

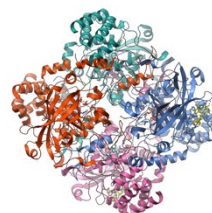
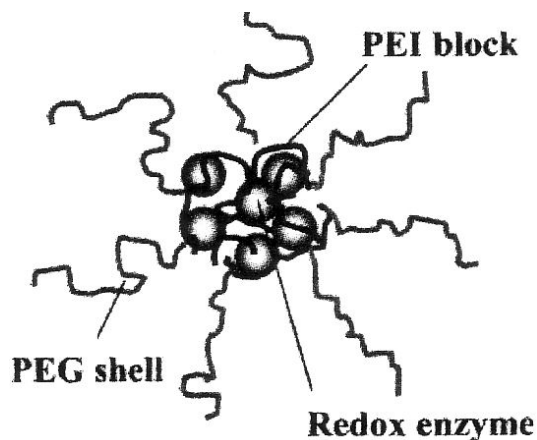
Воспалительные заболевания связаны со
свободно-радикальные процессами:

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

Наночастицы ферментов-антиоксидантов для доставки в ЦНС

Антиоксиданты

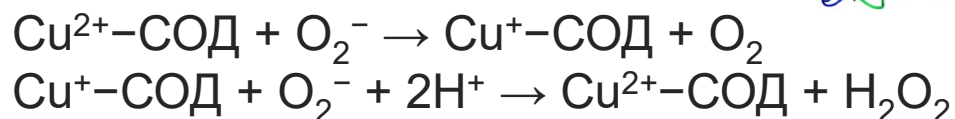
- Низкомолекулярные (витамин С, витамин Е, витамин А, убихинол, липоевая кислота)
- Антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза)



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%

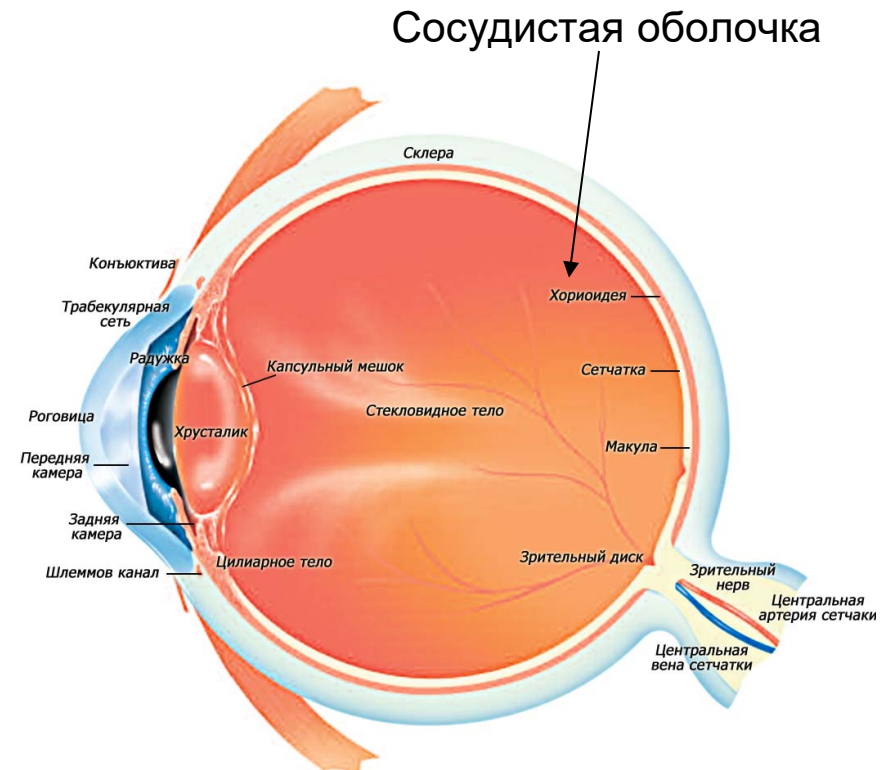
Удельный вес в структуре слепоты – 7-15%

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

Модель увеита позволяет следить за протеканием процессов в разных отделах глаза

Основные этиологические факторы:

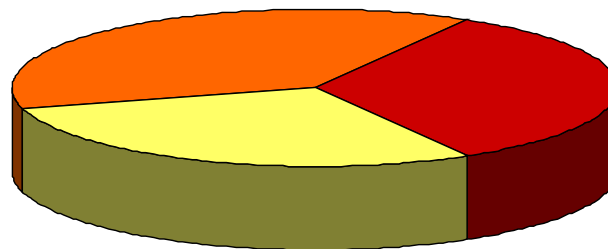
инфекционные;
инфекционно-аллергические;
аллергические неинфекционные;
аутоиммунные



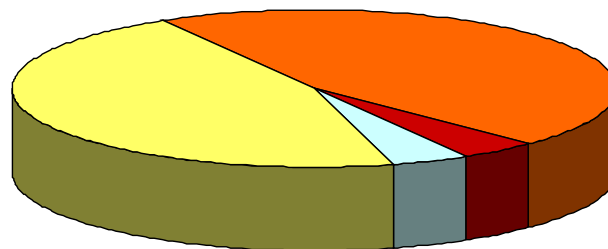
Клинические проявления увеита в острой фазе – гиперемия конъюнктивы, отек век, отек роговицы

клинические
признаки
выражены:

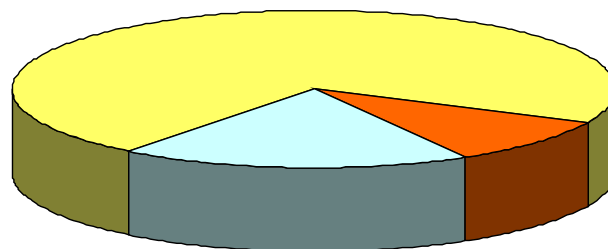
-  нет
-  слабо
-  средне
-  сильно



нелеченные
кролики



кролики,
получавшие
лечение СОД

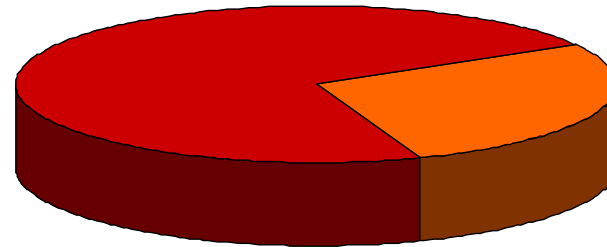


кролики,
получавшие
лечение
наноСОД

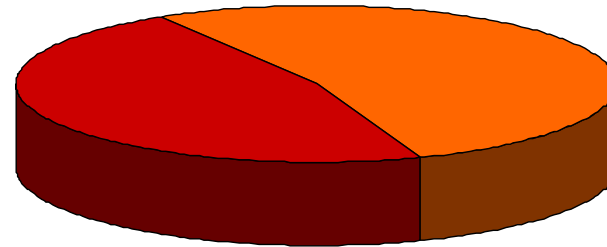
Клинические проявления увеита в острой фазе – помутнение хрусталика, фибриновые отложения, отек радужки

клинические
признаки
выражены:

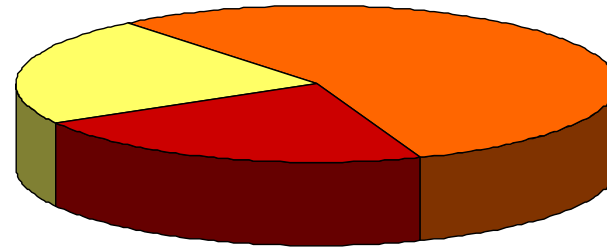
-  слабо
-  средне
-  сильно



нелеченые
кролики



кролики,
получавшие
лечение СОД



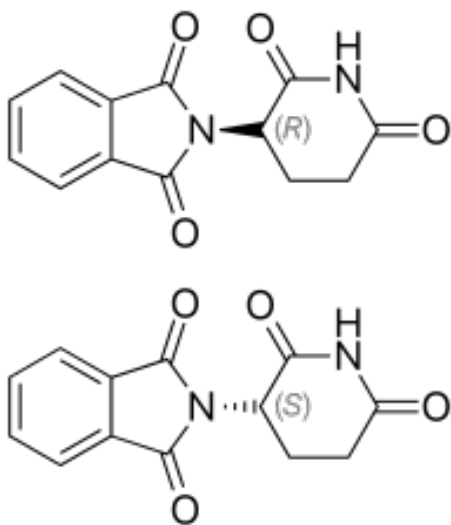
кролики,
получавшие
лечение
наноСОД

Nanotechnology

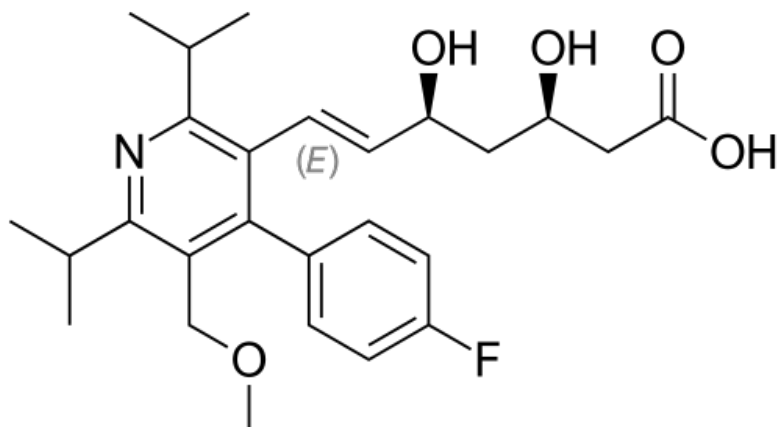
**Biomedical
functions**



**Biological
toxicity**



Thalidomide На рынок вышел в 1957 (Immunoprin, Contergan). Chemie Grunenthal (Германия). Иммуностимулирующее средство. Беременные принимали, т.к. против тошноты. Более 10000 случаев. В 1961 Withdrawn Germany
Withdrawn because of risk of teratogenicity; returned to market for use in leprosy and multiple myeloma under FDA orphan drug rules



Lipobay (Cerivastatin) На рынок вышел в 1997 как препарат, снижающий холестерин (статины). (Байер, Германия).
В 2001 приостановлено продвижение на рынок 52 чел умерли только в США, у 1000 тяжелое поражение мышц
Риск развития миопатии/рабдомиолиза
Разрастание мышечного белка, несет кровь.
Почки не справляются, закупорка почеч структур.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

