

ФЕРМЕНТЫ – белки с особой функцией катализа

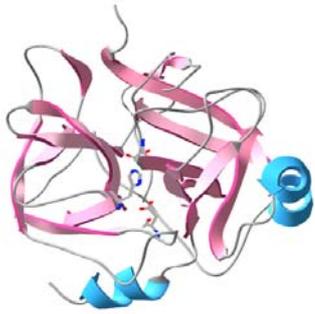
Н.Л.Клячко

Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова

Научно-образовательный центр по нанотехнологиям МГУ

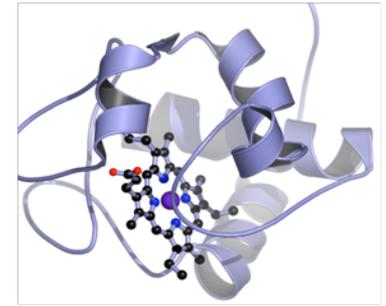
БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

Катализаторы (ферменты) -
Регуляторные белки <ul style="list-style-type: none">- гормоны (инсулин)- транскрипционные факторы (Zn «пальцы»)- киназы и фосфатазы
Транспортные белки – гемоглобин, миоглобин
Структурные белки – коллаген. кератин
Сократительные белки – актин, миозин
Экзотические белки – яды, антифризы



БЕЛКИ

ПРОСТЫЕ И СЛОЖНЫЕ



- Белки содержат только аминокислоты – **простые белки**
- Белки содержат дополнительные компоненты – **сложные белки**
- Небелковые компоненты, необходимые для катализа – **кофакторы, коферменты и простетические группы**

Простетические группы прочно связаны с белковой частью

Белки содержат углеводы (**гликопротеины**: пероксидазы)

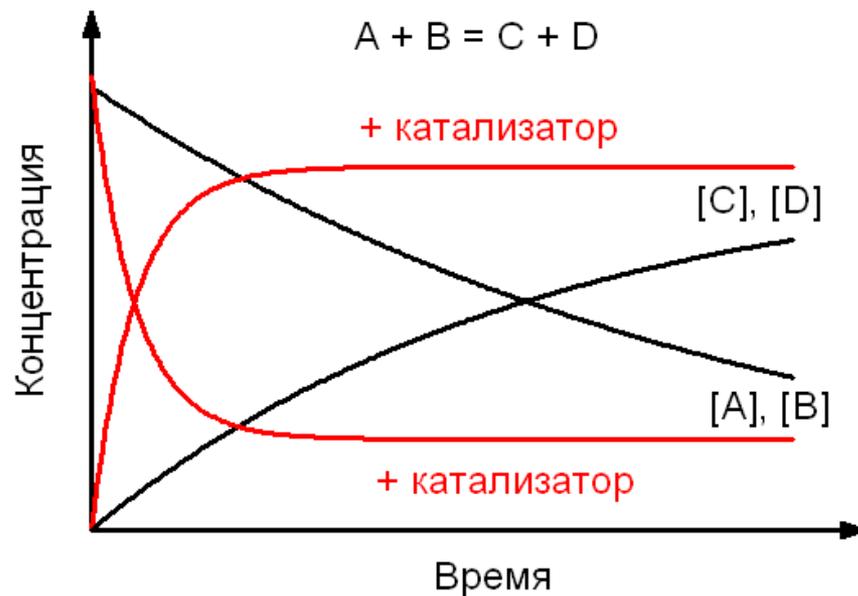
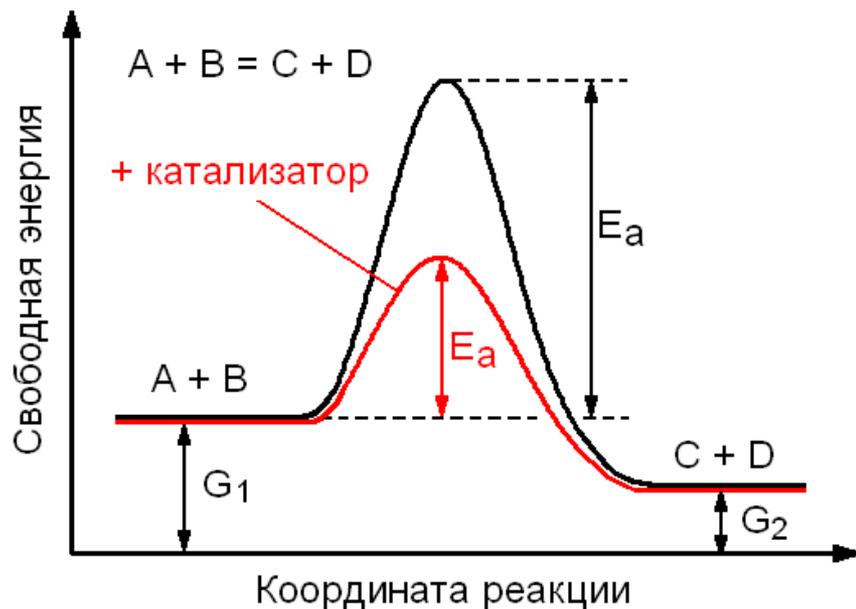
Белки содержат липиды (**липопротеины**: протеинкиназа А)

Белки содержат нуклеотиды (**нуклеопротеины**: флавопротеины)

Металлопротеины, гем-содержащие белки и ферменты, фосфопротеины
(сигнальные белки, фосфорилирование ОН-групп Ser, Thr, Tyr)

Дают химические (перенос гидрид-иона) и структурные (молекулярное узнавание) свойства, которые невозможно покрыть за счет аминокислот

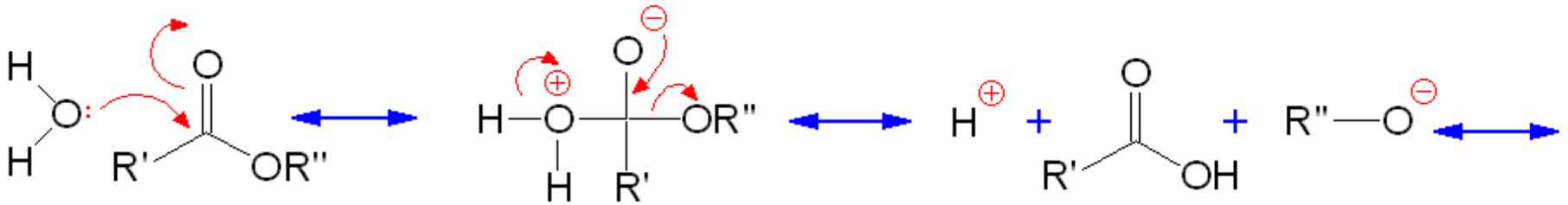
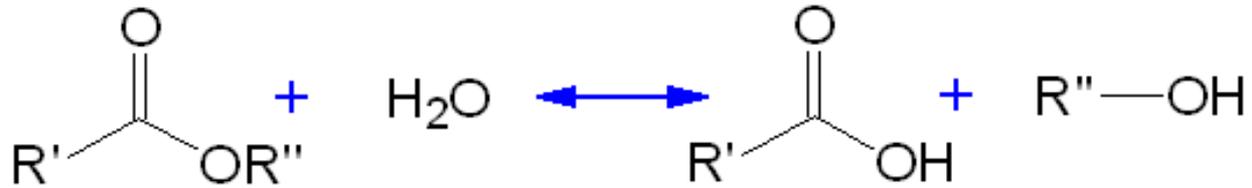
ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ КАТАЛИЗА



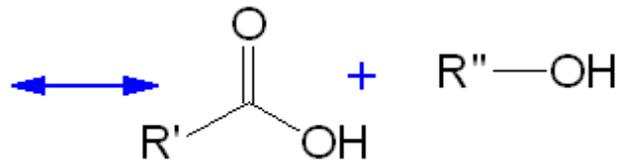
- Не всякая термодинамически выгодная химическая реакция будет идти (энергия активации, переходное состояние)
- Катализатор не влияет на константу равновесия (не изменяет $\Delta G = G_2 - G_1$)
- Катализатор понижает энергию активации

ГИДРОЛИЗ СЛОЖНОГО ЭФИРА

В водной среде при нейтральных pH



Реакция нуклеофильного замещения



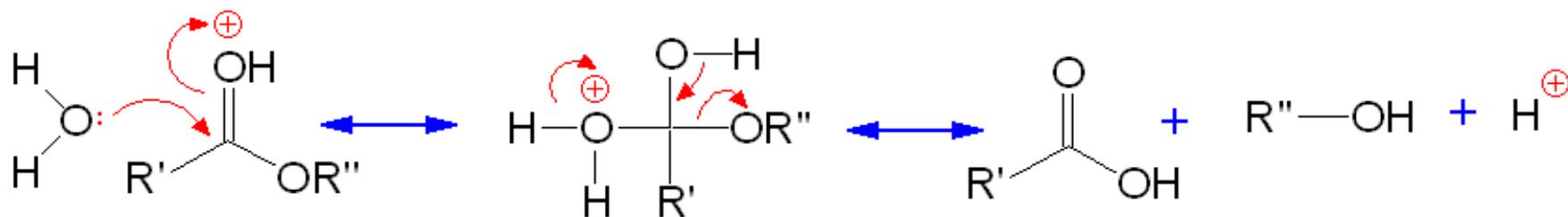
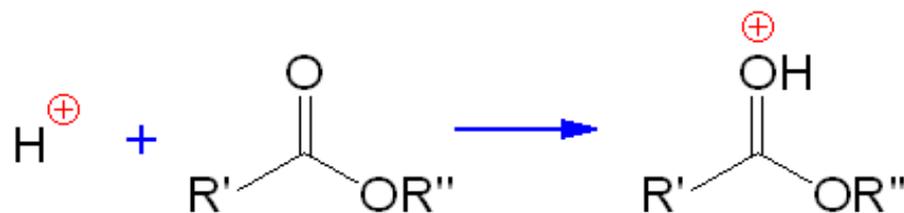
Переходное состояние двухзарядное (положительный и отрицательный заряды вблизи друг друга).

- ⇒ переходное состояние нестабильно;
- ⇒ его образование требует высокой энергии активации;
- ⇒ скорость реакции мала, если она вообще идёт

ОСНОВНЫЕ ТИПЫ КАТАЛИЗА

1. Кислотно-основный катализ (H^+ или OH^-)
2. Электростатический катализ (ионы металлов)
3. Ковалентный катализ (электрофильный или нуклеофильный)
4. Внутримолекулярный катализ

Кислоты могут катализировать реакцию, временно давая H^+ , например, эфиру

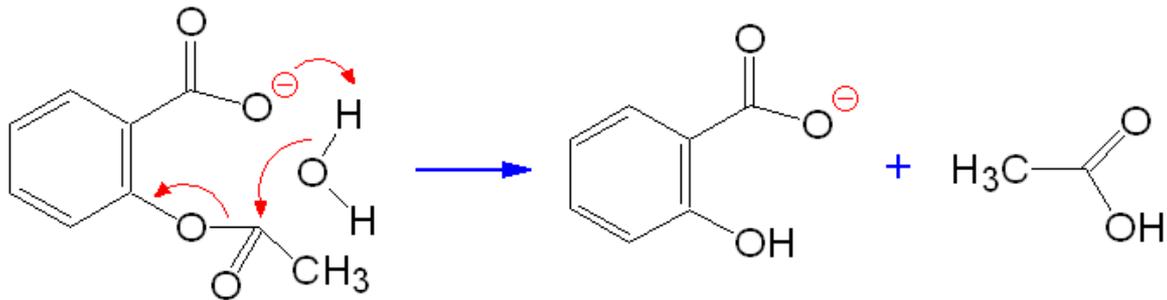


Протонированная форма эфира атакуется водой

Более стабильное переходное состояние \Rightarrow скорость выше

ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЙ КАТАЛИЗ

Пример – гидролиз аспирина. Гидролиз эфирной связи ускоряется с помощью внутримолекулярного обще-основного катализа. Скорость реакции увеличивается в 200 раз.



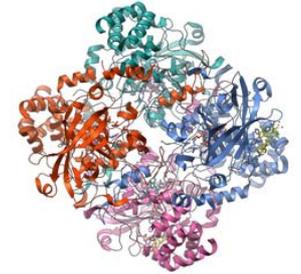
Энтропия – важный фактор катализа

Реакции в растворе ⇒ **сближение реагирующих молекул** ⇒ **уменьшение энтропии**

Ферментативные реакции в пределах ES комплекса ⇒ эффективная концентрация каталитических групп высока по сравнению с реакцией в растворе ⇒ выигрыш в энергии оплачен энергией связывания субстрата ферментом

Уменьшение энтропии поступательного и вращательного движения происходит не на химической стадии реакции.

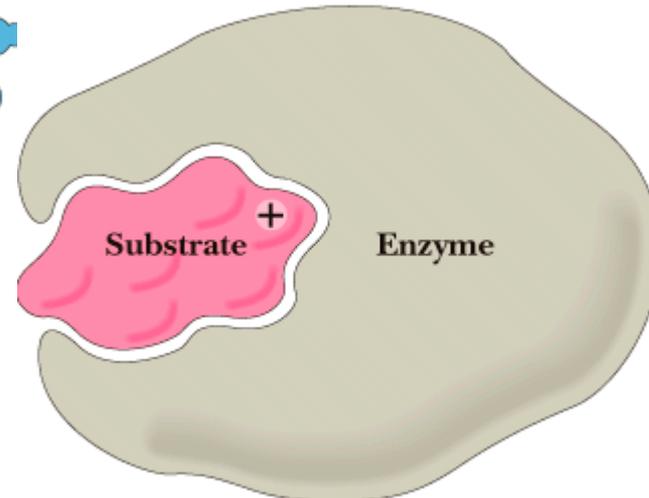
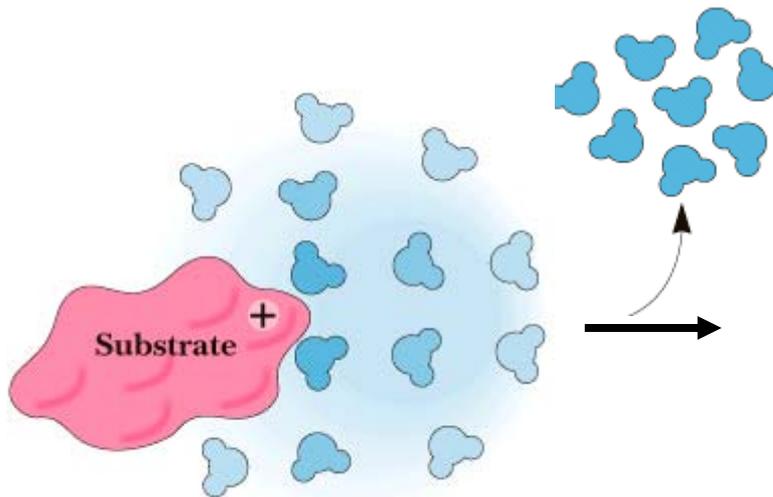
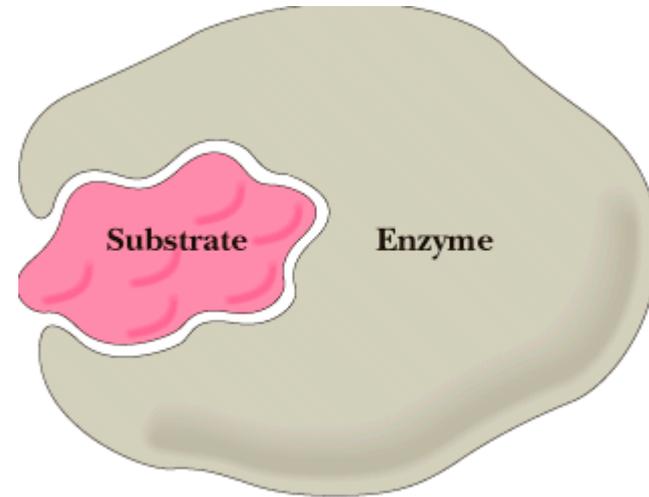
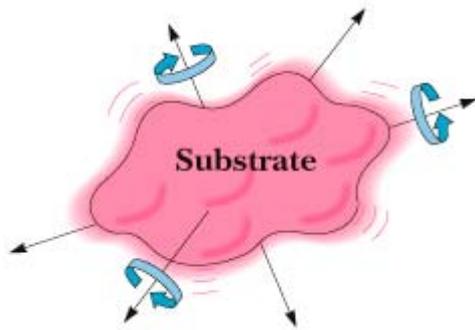
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ



Катализатор	E_a , кДж/моль	Относительная скорость при 25°C.
нет	70	1
Pt (гетерогенный катализ)	45	2100
Fe^{2+} (гомогенный катализ)	42	8100
каталаза	7	$9 \cdot 10^{10}$

Е и S свободны (поступательные, вращательные, колебательные движения) → выс. энтропия

Упорядоченный ES комплекс - низ. энтропия



Сольватная оболочка

Десольватированный ES комплекс

КАТАЛИЗ ФЕРМЕНТАМИ: ОСОБЕННОСТИ

1. Особый участок – активный центр
2. Образование фермент-субстратного комплекса (ES комплекс)
 - А. Многоточечное взаимодействие с субстратом
 - Б. Сближение и ориентация или перевод реакции во внутримолекулярный режим
3. Эстафетная передача заряда – повышение нуклеофильности реагирующих групп
4. Поддержание микроокружения активного центра в состоянии отличном от водного раствора (вытеснение воды из активного центра) \Rightarrow выигрыш в ориентации боковых цепей
5. Стабилизация переходного состояния (средство фермента выше к переходному состоянию, не к субстрату) \Rightarrow понижение свободной энергии переходного состояния

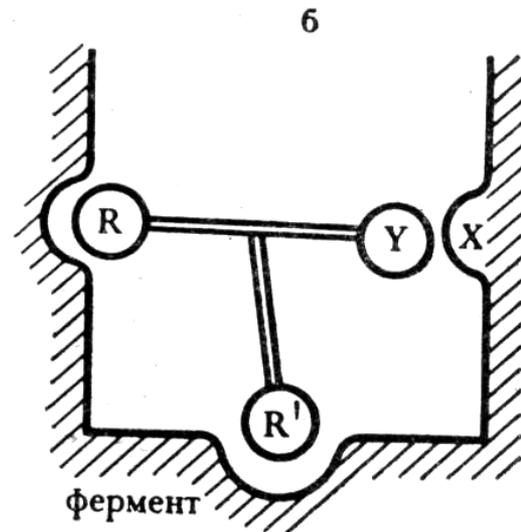
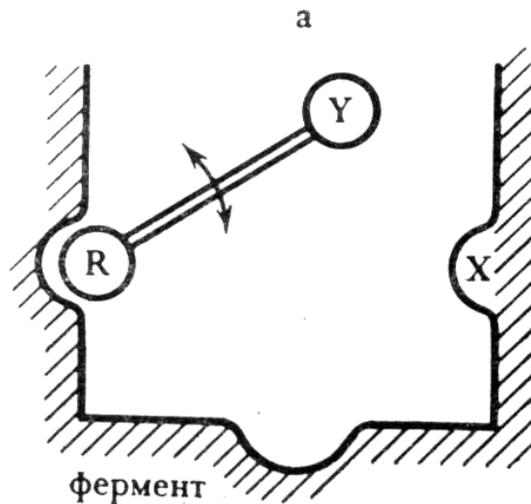
Эффективность ферментативного катализа

- **ФАКТОРЫ (ЭФФЕКТЫ) УСКОРЕНИЯ ХИМИЧЕСКИХ (ФЕРМЕНТАТИВНЫХ) РЕАКЦИЙ**

I - СБЛИЖЕНИЕ (КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ)

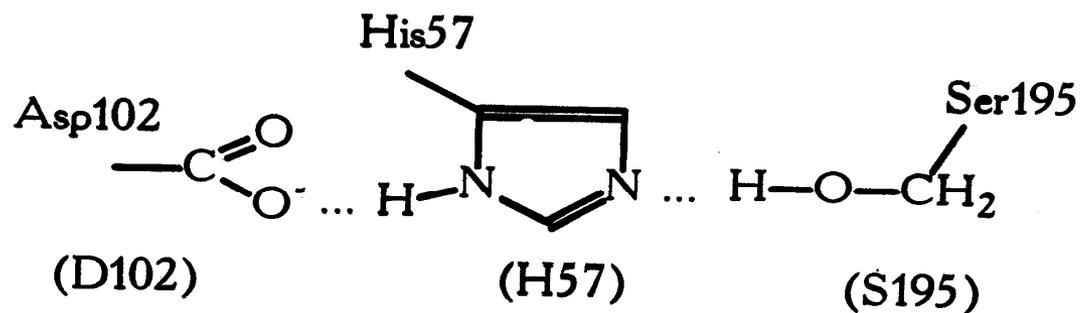
II - ОРИЕНТАЦИЯ

III - ЭФФЕКТЫ СРЕДЫ



Взаимодействия в белковой молекуле

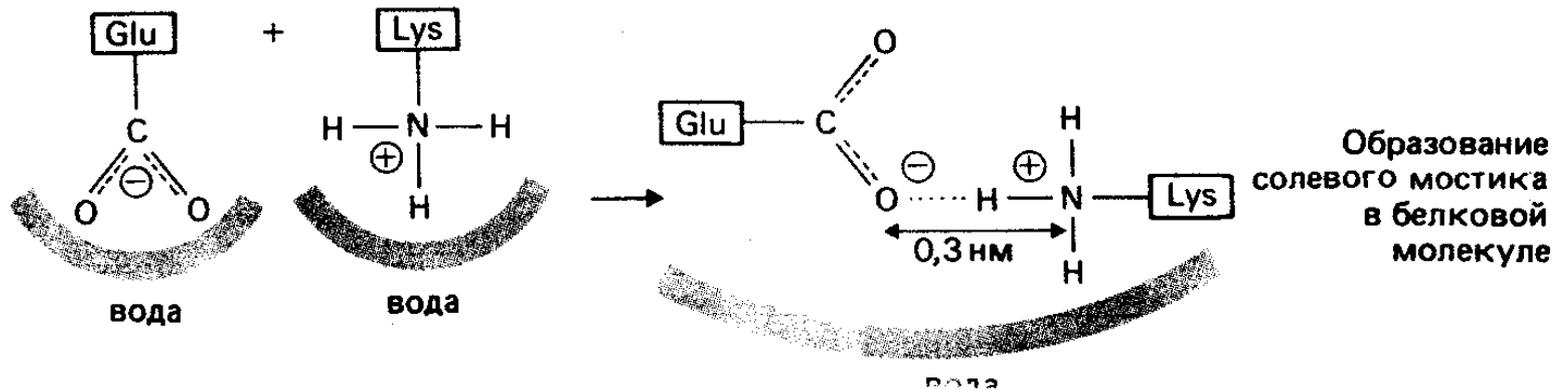
Водородные связи



$$\Delta G_0 = 0.5 - 1.8 \text{ ккал/моль}$$

Взаимодействия в белковой молекуле

Электростатические взаимодействия



$$\Delta G_0 = -3 - 4 \text{ ккал/моль}$$

Электростатические взаимодействия слабо проявляются в концентрированных растворах электролитов

Взаимодействия в белковой молекуле

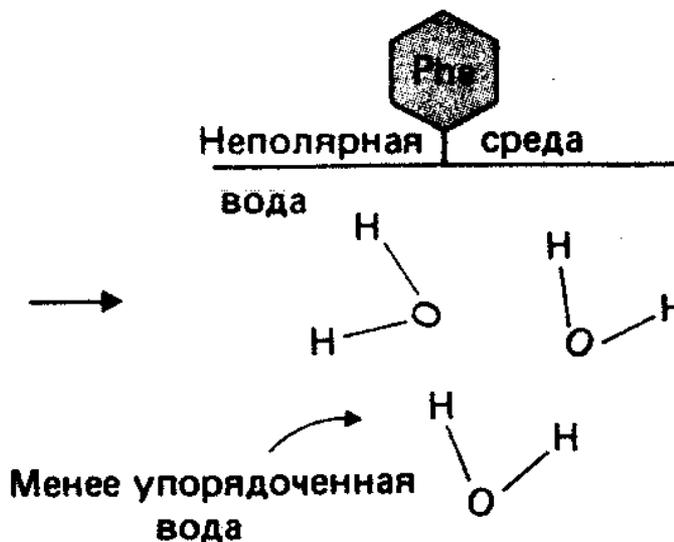
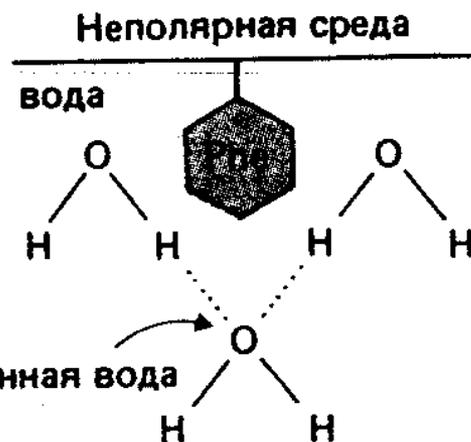
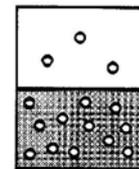
Гидрофобные взаимодействия

$$\Delta G = -RT \ln P = -RT \ln \frac{[A]_{\text{ОКТ}}}{[A]_{\text{ВОДА}}}$$

Параметр гидрофобности Ганша (C. Hansch)

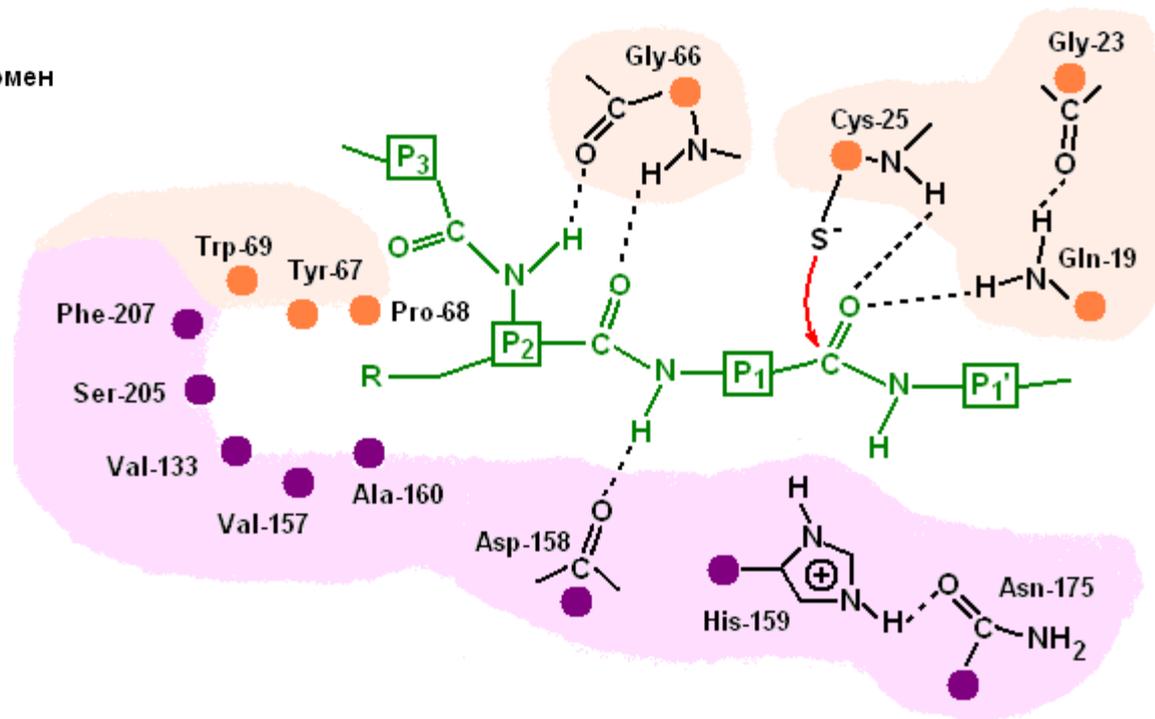
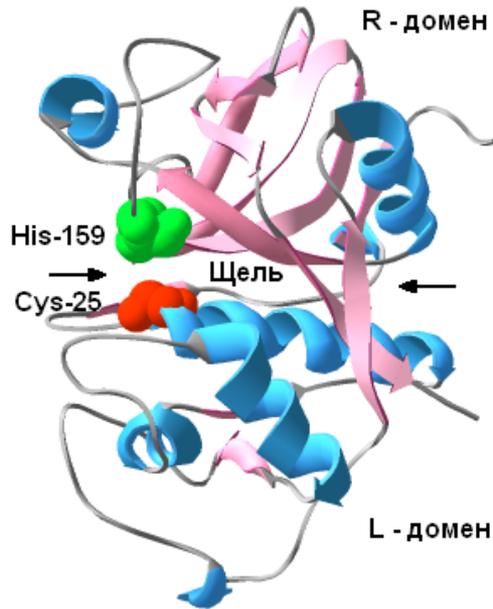
$$\pi = \lg P_{\text{RX}} - \lg P_{\text{RH}} = \lg \frac{P_{\text{RX}}}{P_{\text{RH}}}$$

$$\Delta\Delta G(\text{CH}_2) \sim 750 \text{ кал/моль}$$



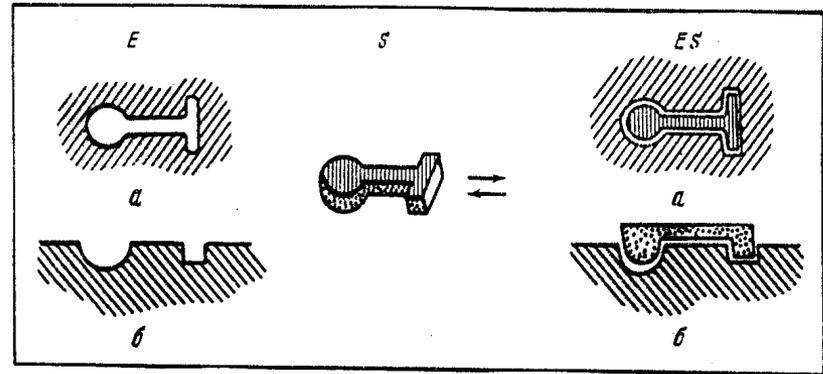
Переход боковой цепи остатка Phe из раствора внутрь белковой молекулы

ПАПАИН: взаимодействие субстрата с активным центром фермента

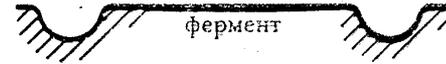


Теории ферментативного катализа

- Концепция «ключ-замок» (Э. Фишер)



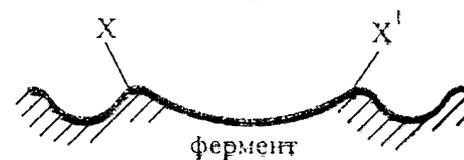
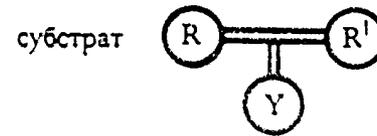
- Теория напряжения (дыбы) (Р. Ламри, В. Дженкс).



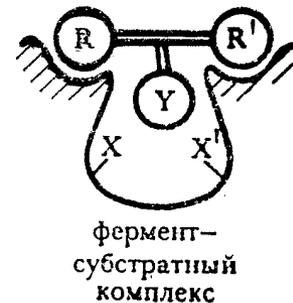
III



- Теория индуцированного соответствия. (Д. Кошланд)

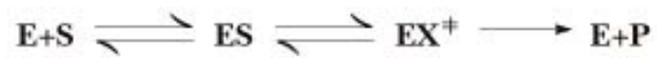
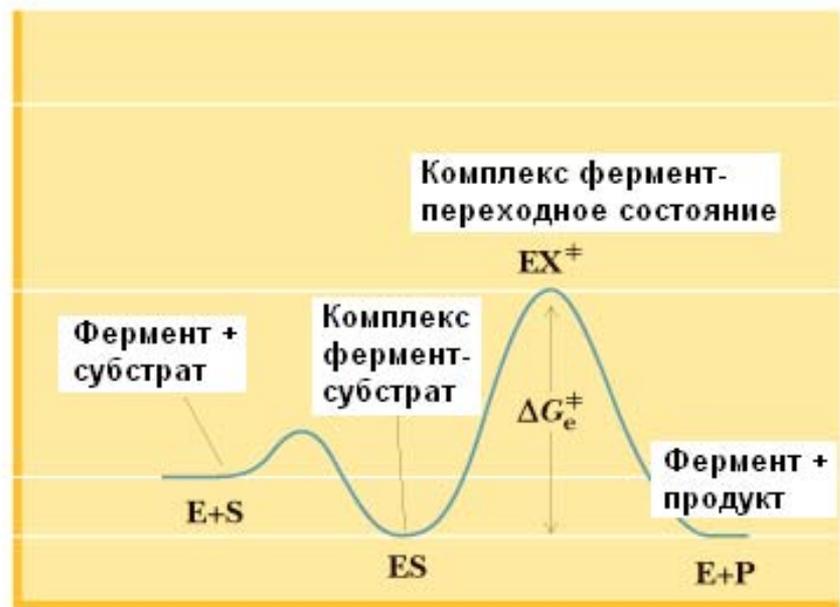
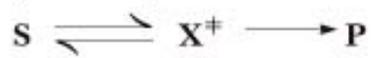


II





Координата реакции \longrightarrow

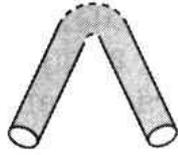


Предпочтительно связывание в переходном состоянии?

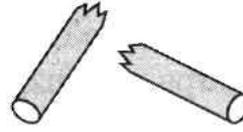
No enzyme



Substrate
(metal stick)

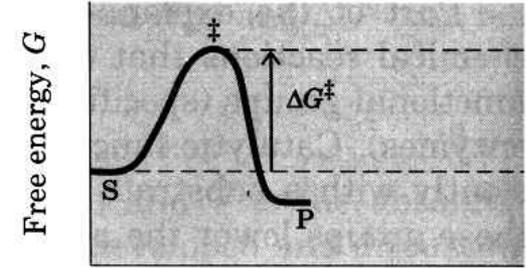


Transition state
(bent stick)

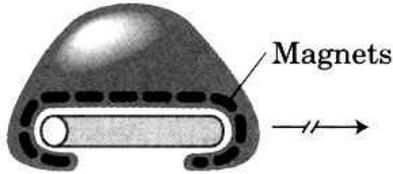


Products
(broken stick)

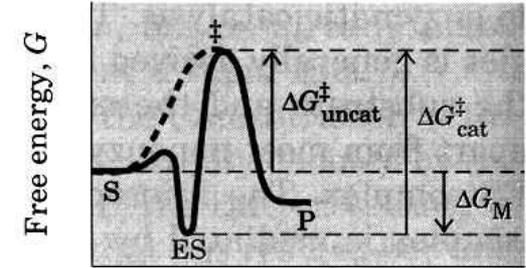
(a)



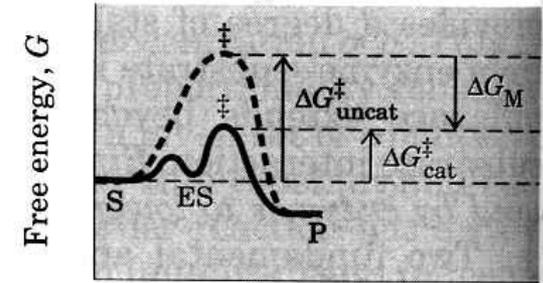
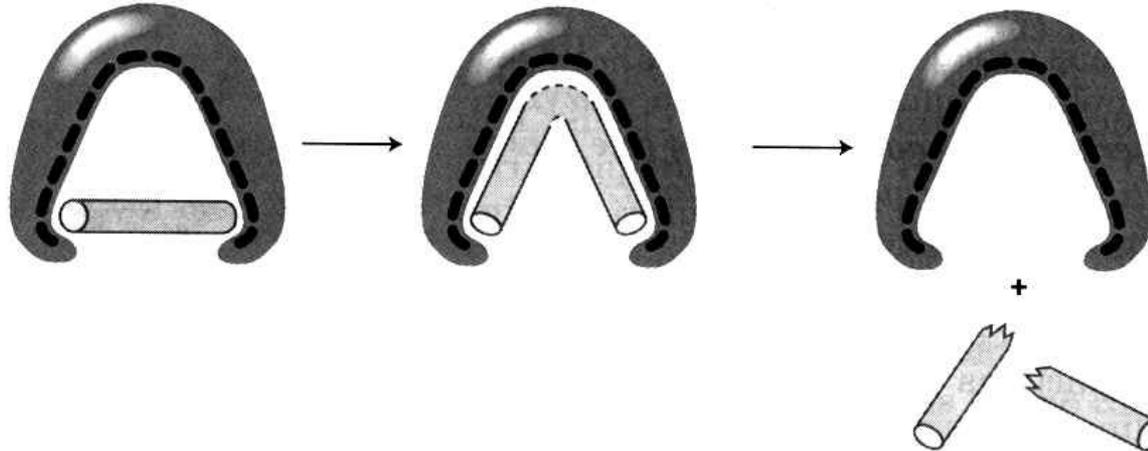
Enzyme complementary to substrate



(b)

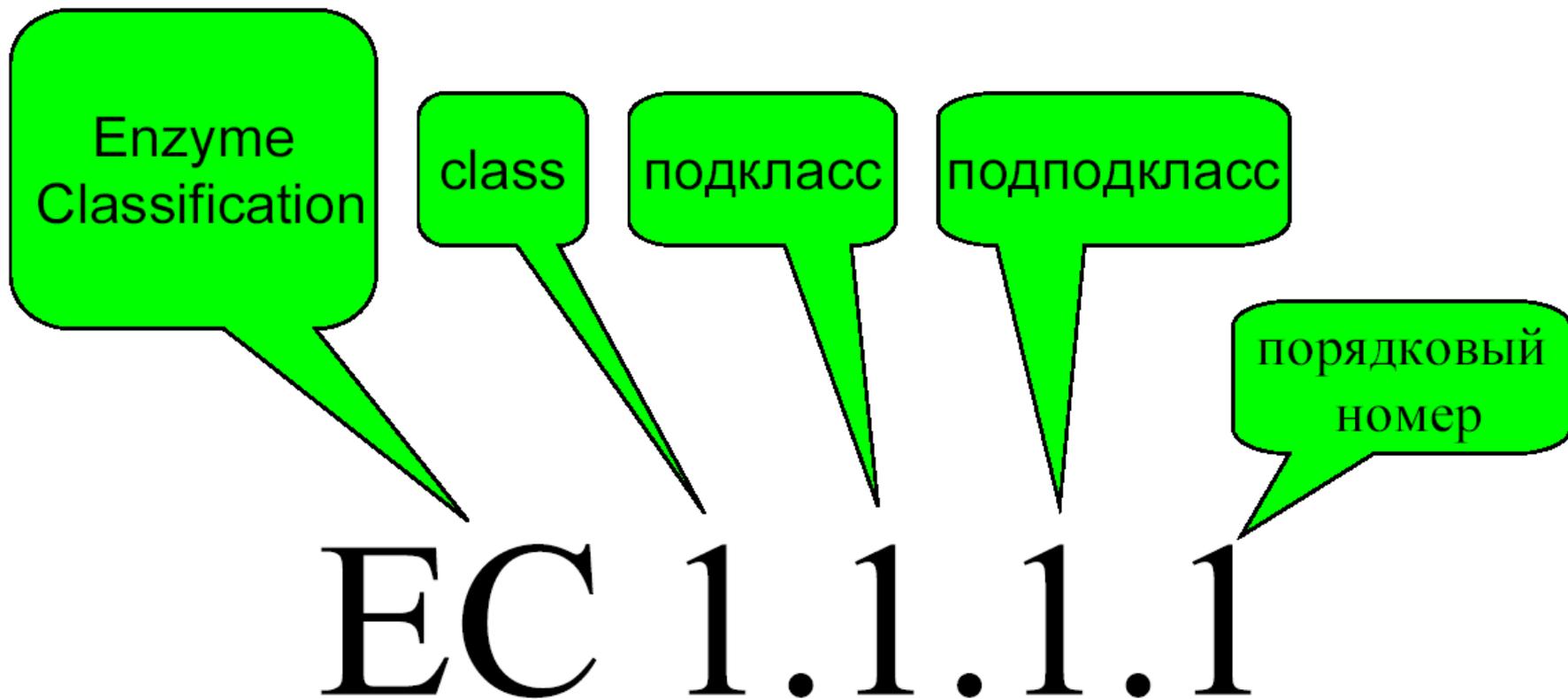


Enzyme complementary to transition state



Reaction coordinate

Классификация энзимов – E.C. (Enzyme Classification)



КЛАССЫ ФЕРМЕНТОВ

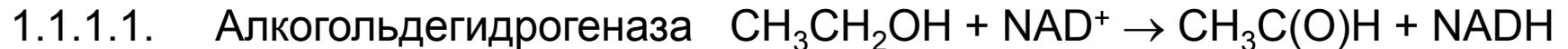
1. Оксидоредуктазы

Доноры электронов CH – OH, CH – CH, C = O, CH – NH₂ и др.

В подклассе **1.X** X определяется типом донора электронов:



1.X.Y Y определяется типом акцептора электронов:



2. Трансферазы

Перенос группы A с субстрата S1 на субстрат S2 (A, S1 ≠ H₂O или OH)

Некоторые подклассы:

2.1. Ферменты, переносящие одноуглеродный остаток,

2.2. Ферменты, переносящие кетонную группу C = O,

2.4. Ферменты, переносящие гликозил,

2.7. Ферменты, переносящие фосфорсодержащую группу



КЛАССЫ ФЕРМЕНТОВ (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

3. Гидролазы

Гидролиз эфирных, сложноэфирных, пептидных и гликозильных связей, кислотных ангидридов, связей C – C, C – Hal и P – N

Некоторые подклассы:

3.1. Ферменты, действующие на сложные эфиры,

3.2. Ферменты, действующие на гликозиды,

3.3. Ферменты, действующие на простые эфиры,

3.4. Ферменты, действующие на пептиды

3.4.21.1. Химотрипсин $RC(O)-NH-CH_2R' + H_2O \rightarrow RC(O)OH + NH_2CH_2R'$

3.1.1.7. Ацетилхолинэстераза $RC(O)-O-CH_2R' + H_2O \rightarrow RC(O)OH + HOCH_2R'$

4. Лиазы

Отщепление групп от субстратов (C – C, C – O, C – N) по негидролитическому механизму с образованием двойной связи (C = C, C = O, C = N) или присоединение по двойной связи.

Подклассы:

4.1. Ферменты, действующие на связь C – C,

4.2 Ферменты, действующие на связь C – O.

4.1.1.1. Пируватдекарбоксилаза $CH_3C(O)COO^- + H^+ \rightarrow CH_3CHO + CO_2$

КЛАССЫ ФЕРМЕНТОВ (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

5. Изомеразы

Взаимопревращения оптических, геометрических и химических изомеров

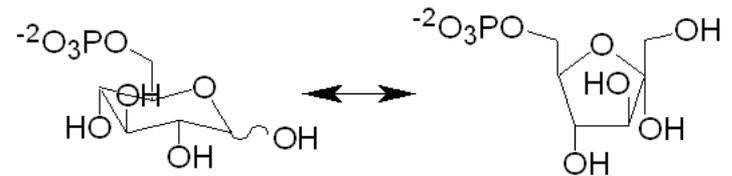
Некоторые подклассы:

5.1. Рацемазы и эпимеразы,

5.2. Цис-транс-изомеразы,

5.3. Внутримолекулярные оксидоредуктазы

5.3.1.9. Глюкозо-6-фосфатизомераза:



6. Лигазы

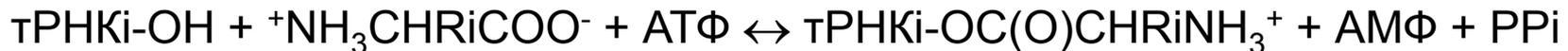
Присоединение двух молекул, сопряженное с разрывом пиррофосфатной связи АТФ или подобного соединения. Ферменты, катализирующие реакции, в ходе которых образуются связи С – О, С – S, С – N и С – С

Некоторые подклассы:

6.1. Ферменты, образующие связи С – О,

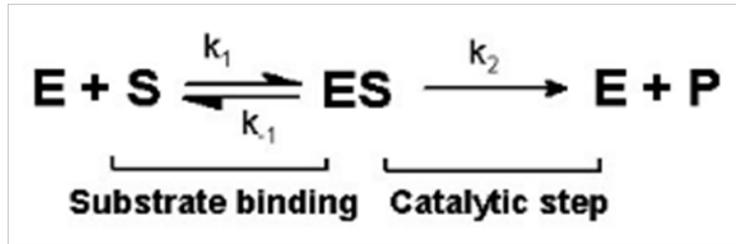
6.4. Ферменты, образующие связи С – С.

6.1.1. Лигазы, образующие аминоксил-тРНК:



ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА

Уравнение Михаэлиса-Ментен



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

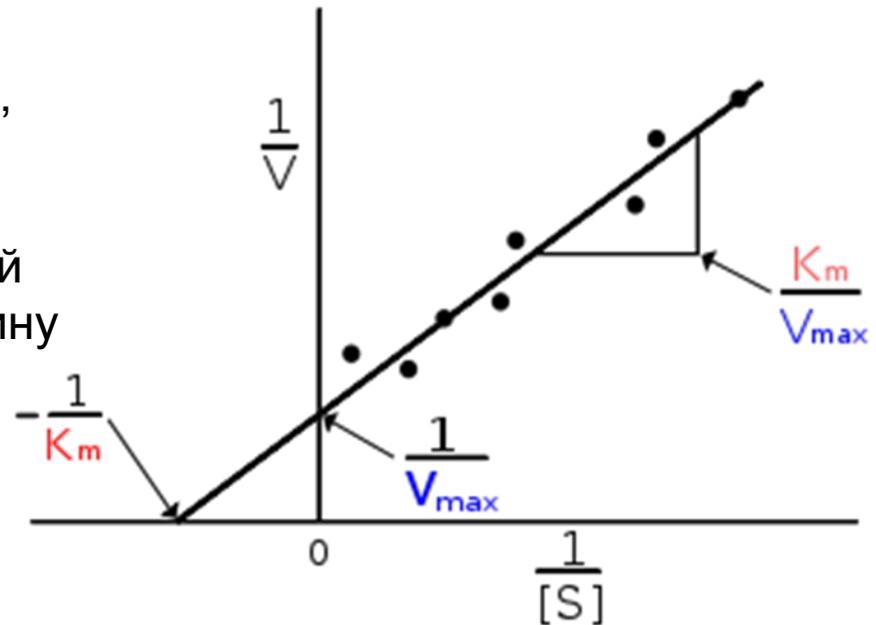
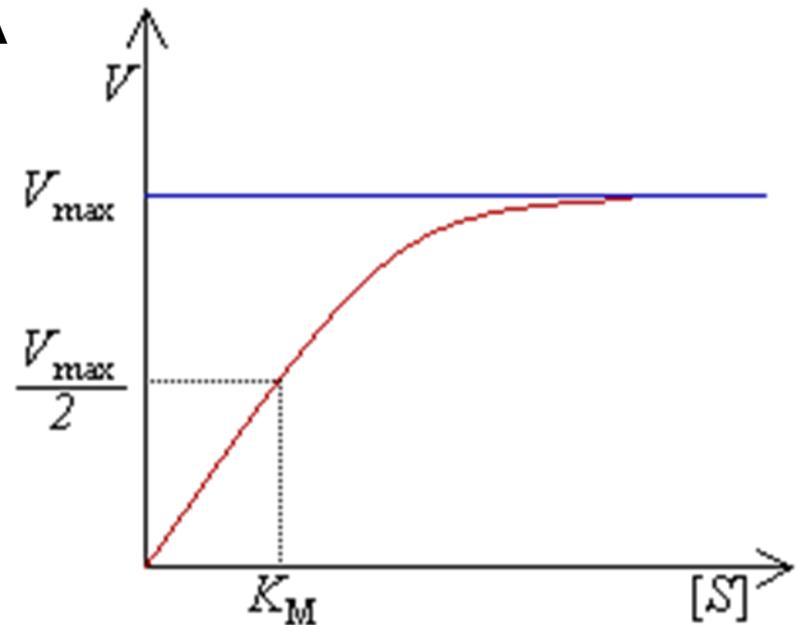
$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

где

V_m — максимальная скорость реакции, равная $k_{cat} E_0$

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

S — концентрация субстрата.



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

- Удивительная эффективность ферментов

Число оборотов некоторых ферментов

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

РЕГУЛЯЦИЯ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

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

Ингибиторы обратимые

Конкурентные

Неконкурентные

Бесконкурентные

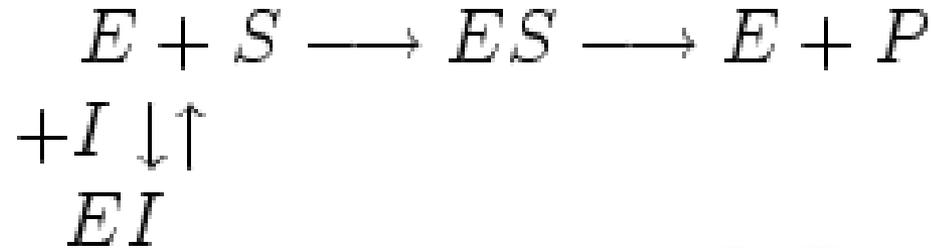
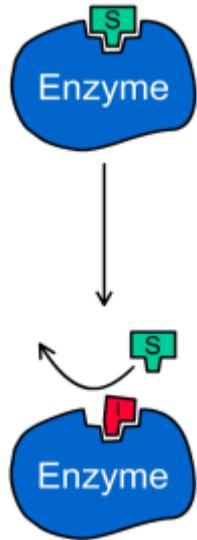
Ингибиторы необратимые

Модификаторы

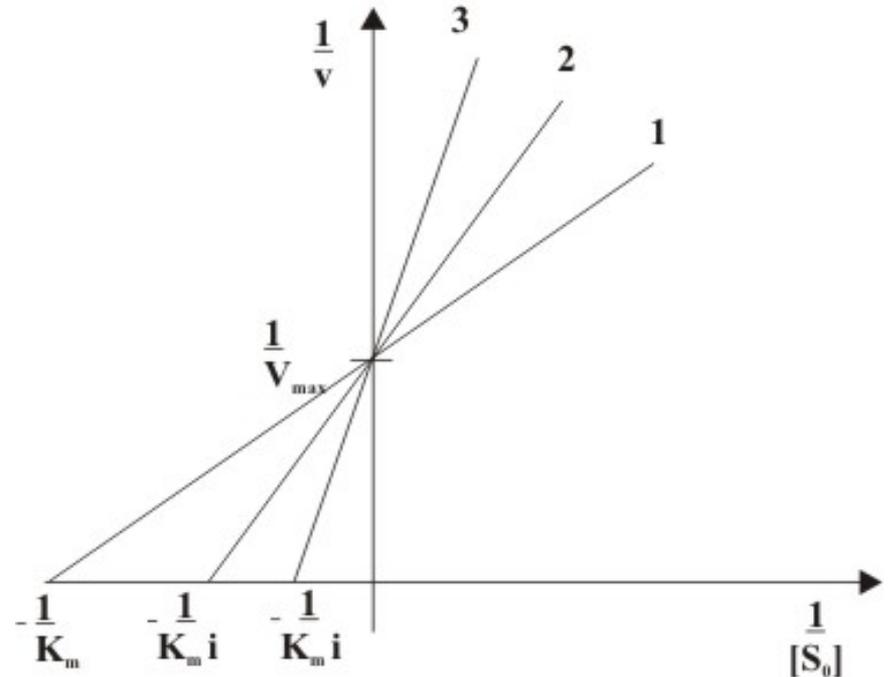
Субстратоподобные
(суицидные)

ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ

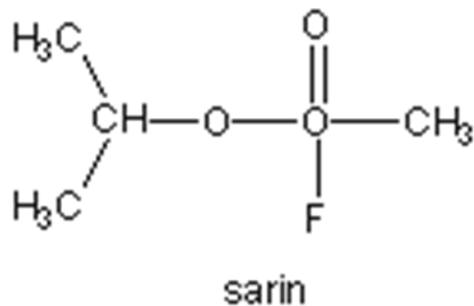
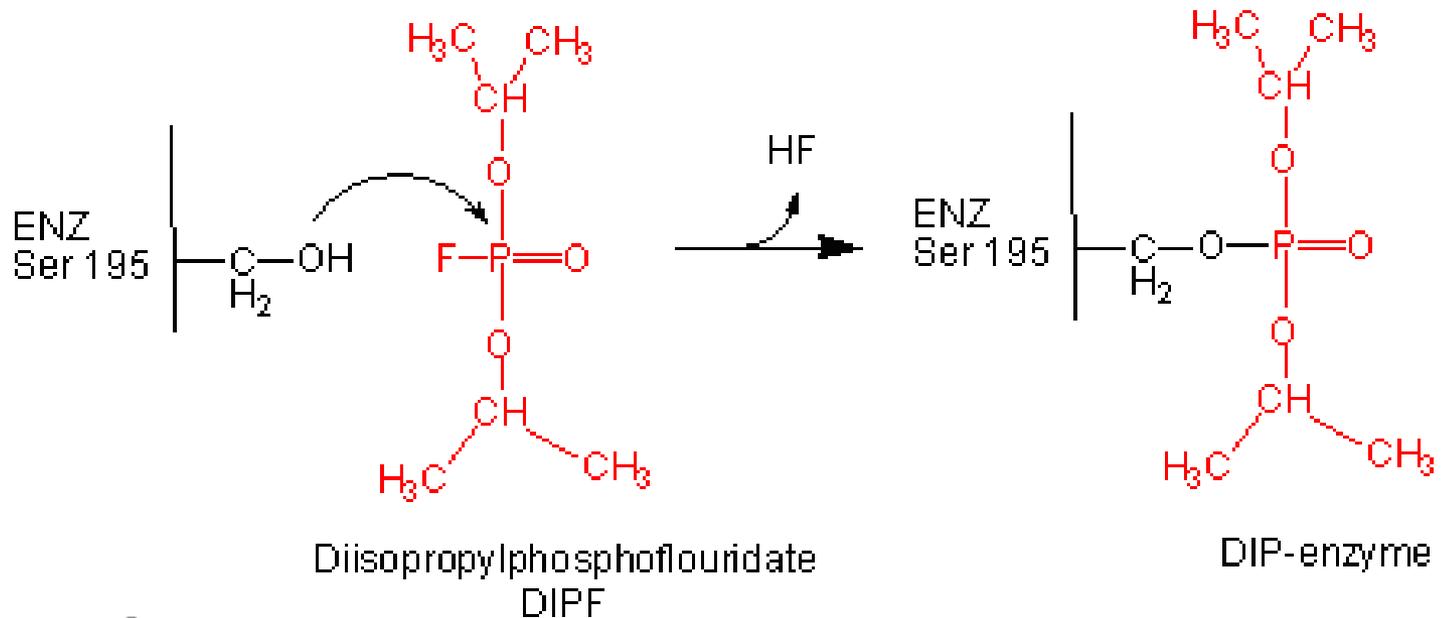
Обратимое конкурентное



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

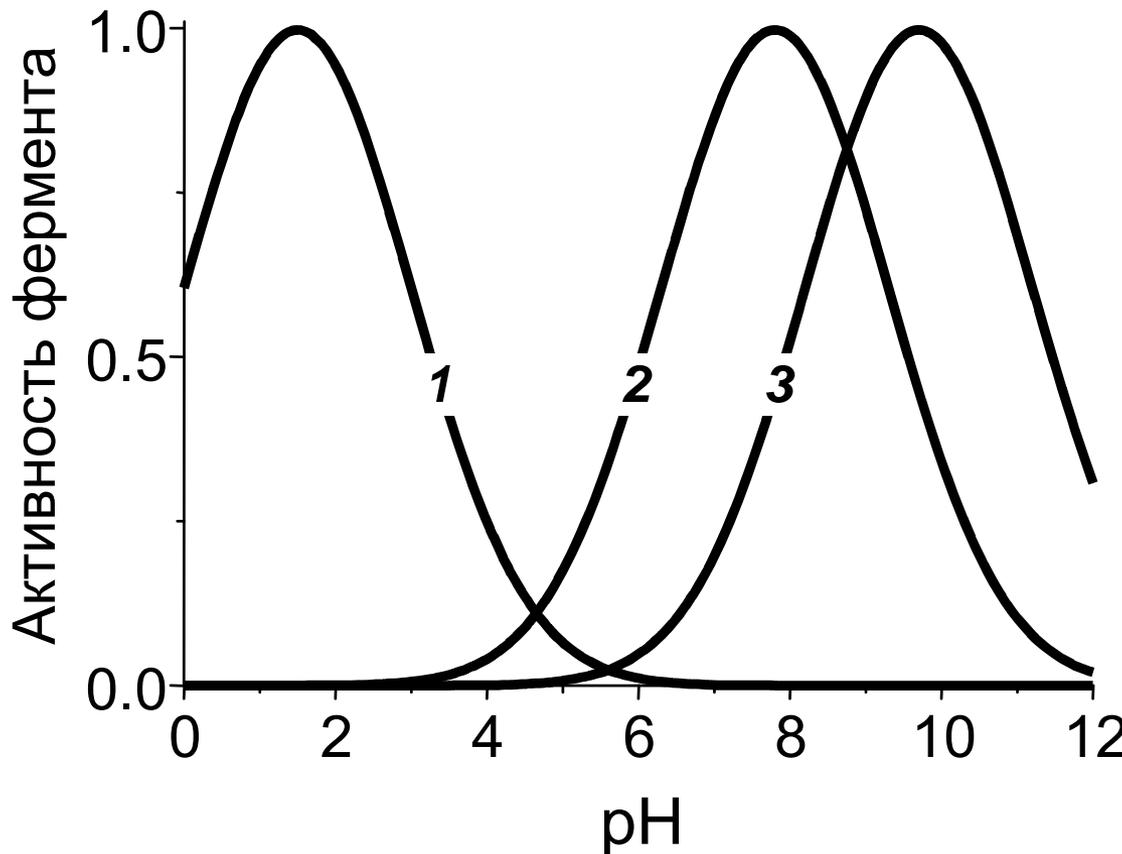


НЕОБРАТИМОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ СЕРИНОВЫХ ГИДРОЛАЗ



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

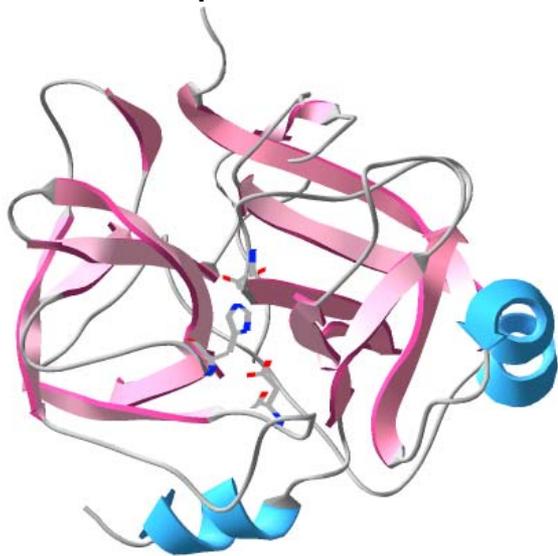
Кинетика ферментативных реакций

Зависимость скорости ферментативных реакций от pH

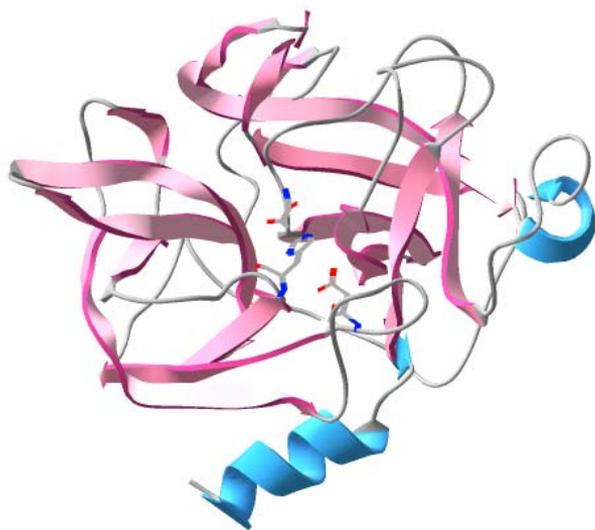
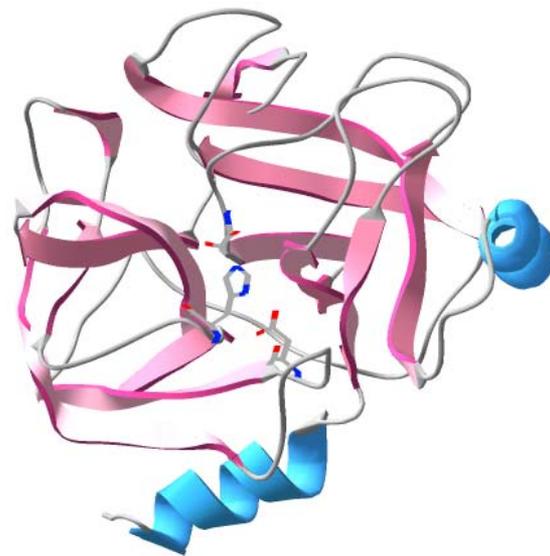
Оптимальные значения pH для некоторых ферментов

Фермент	Оптимум pH
Пепсин	1,5
Трипсин	7,7
Каталаза	7,6
Аргиназа	9,7
Фумараза	7,8
Рибонуклеаза	7,8

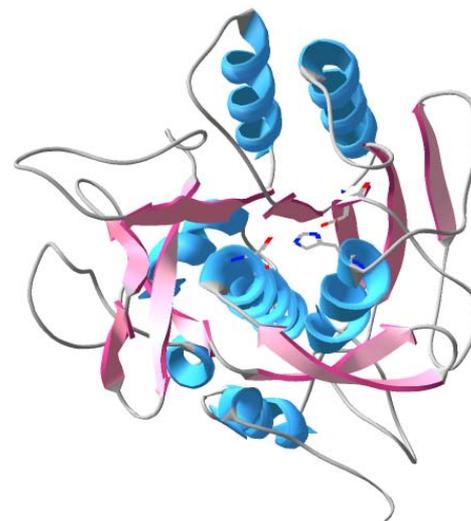
Химотрипсин



Трипсин

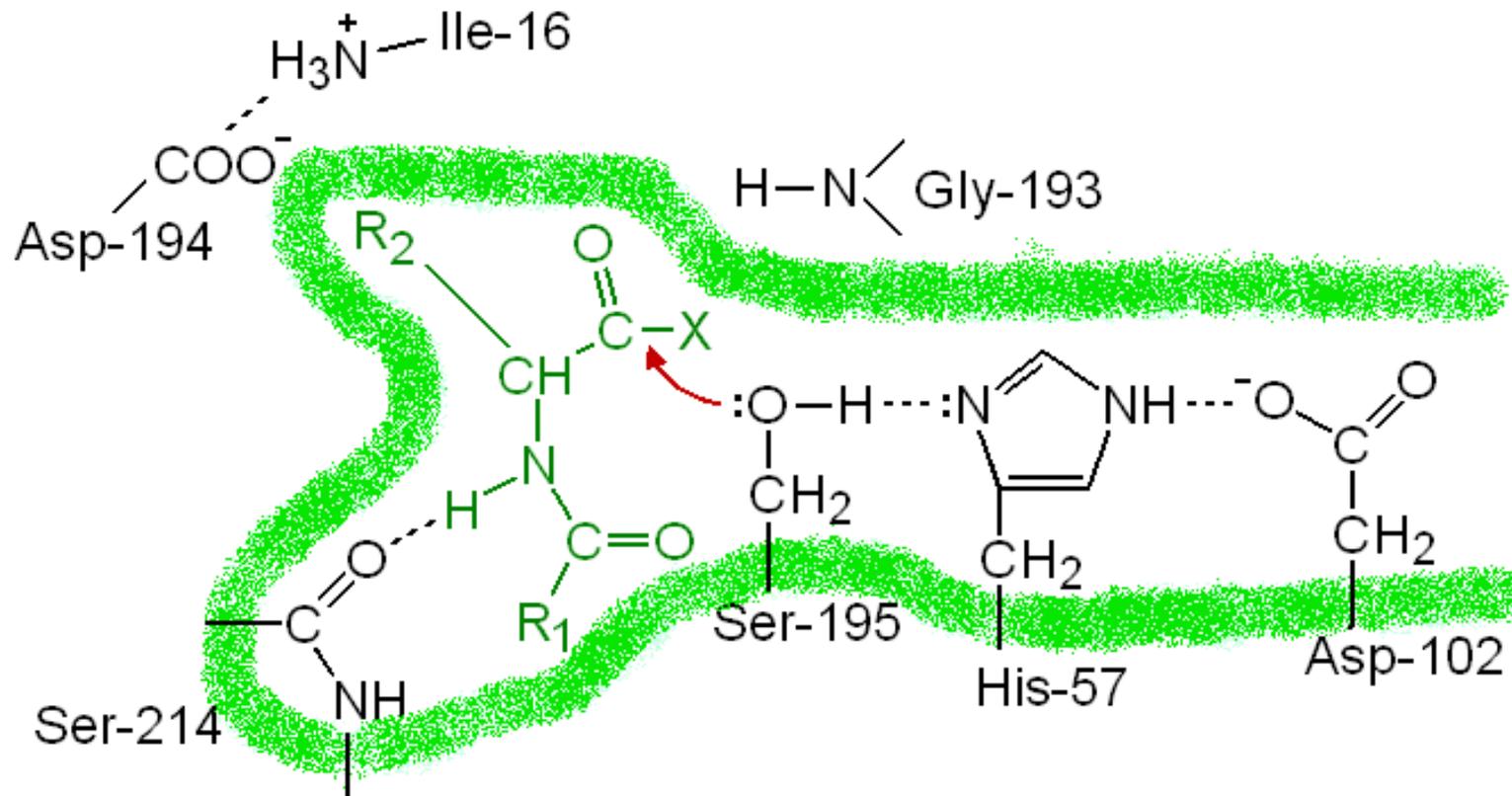


Эластаза

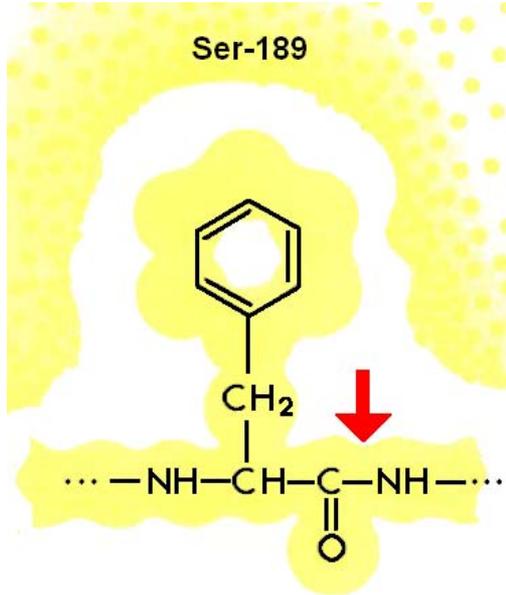


Субтилизин (Карлсберг)

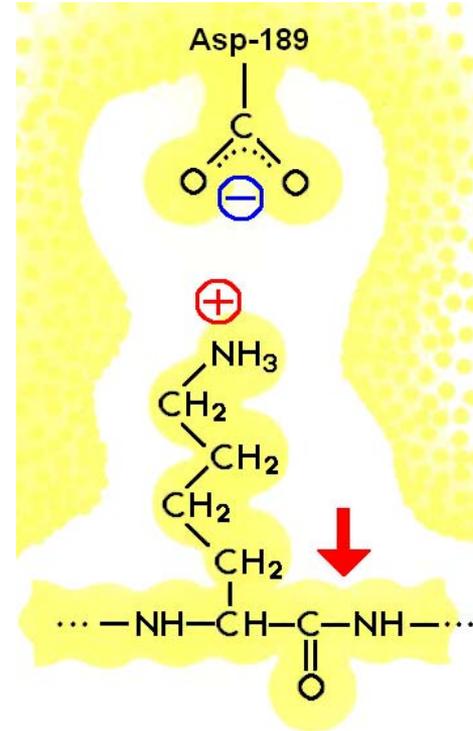
АКТИВНЫЙ ЦЕНТР ХИМОТРИПСИНА



ГИДРОФОБНЫЙ КАРМАН СЕРИНОВЫХ ГИДРОЛАЗ

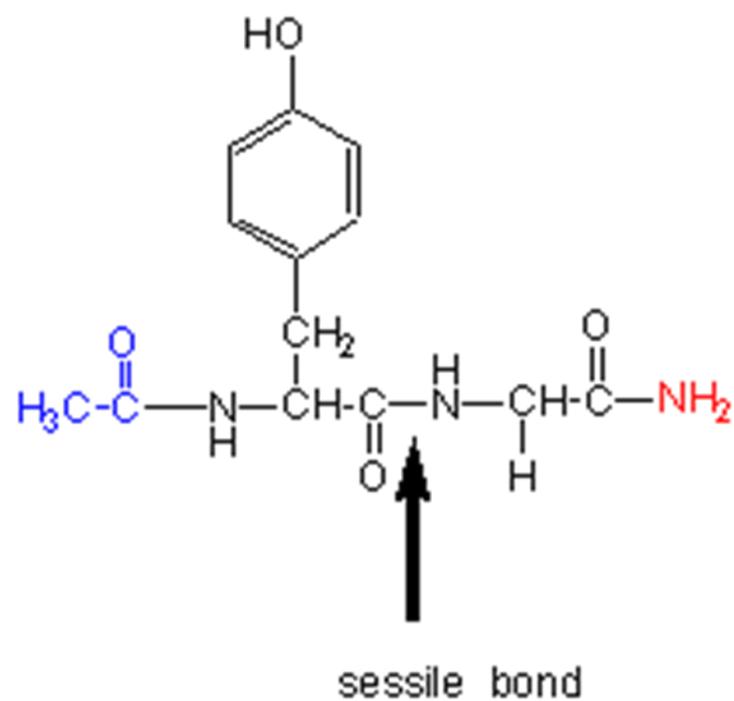


Химотрипсин

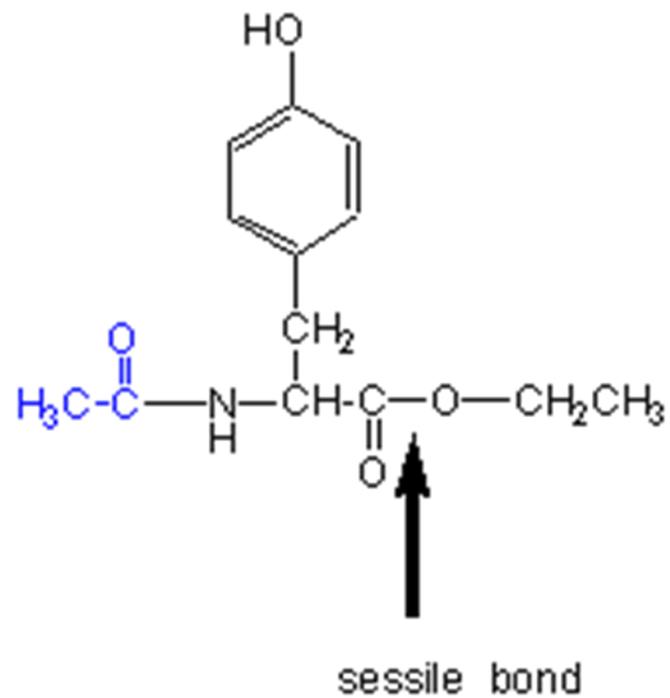


Трипсин

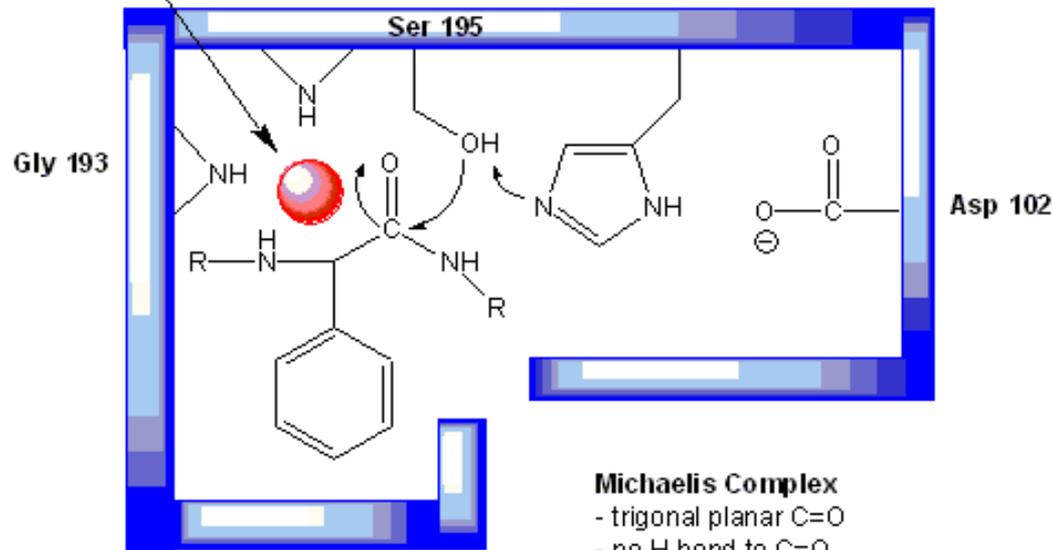
N-acetyl-L-Tyr-Gly-**amide**



N-acetyl-L-Tyr-**ethylester**

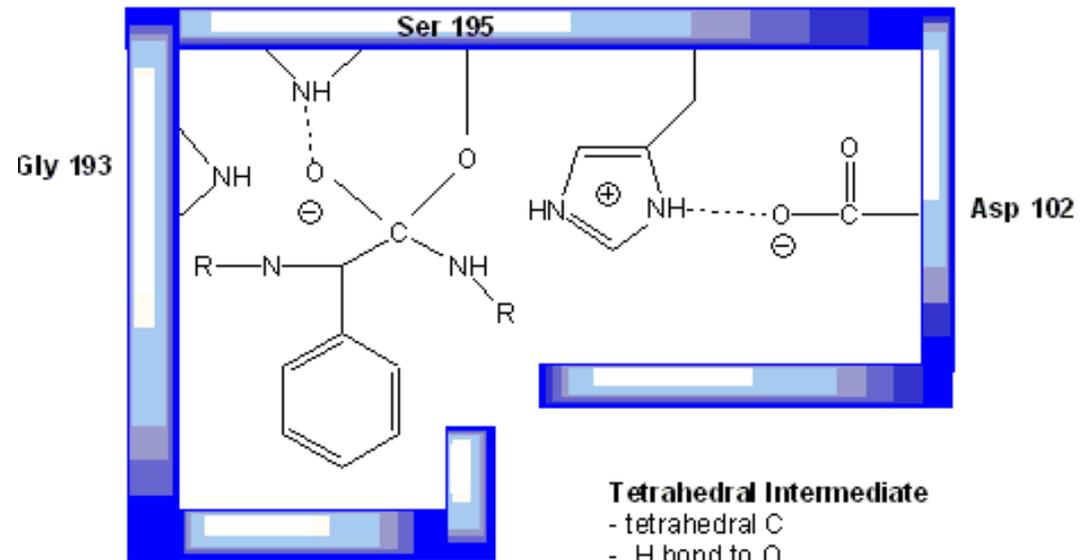
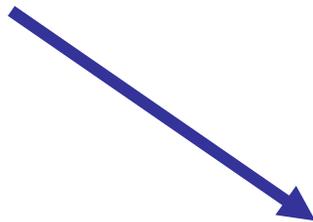


oxyanion hole



Michaelis Complex

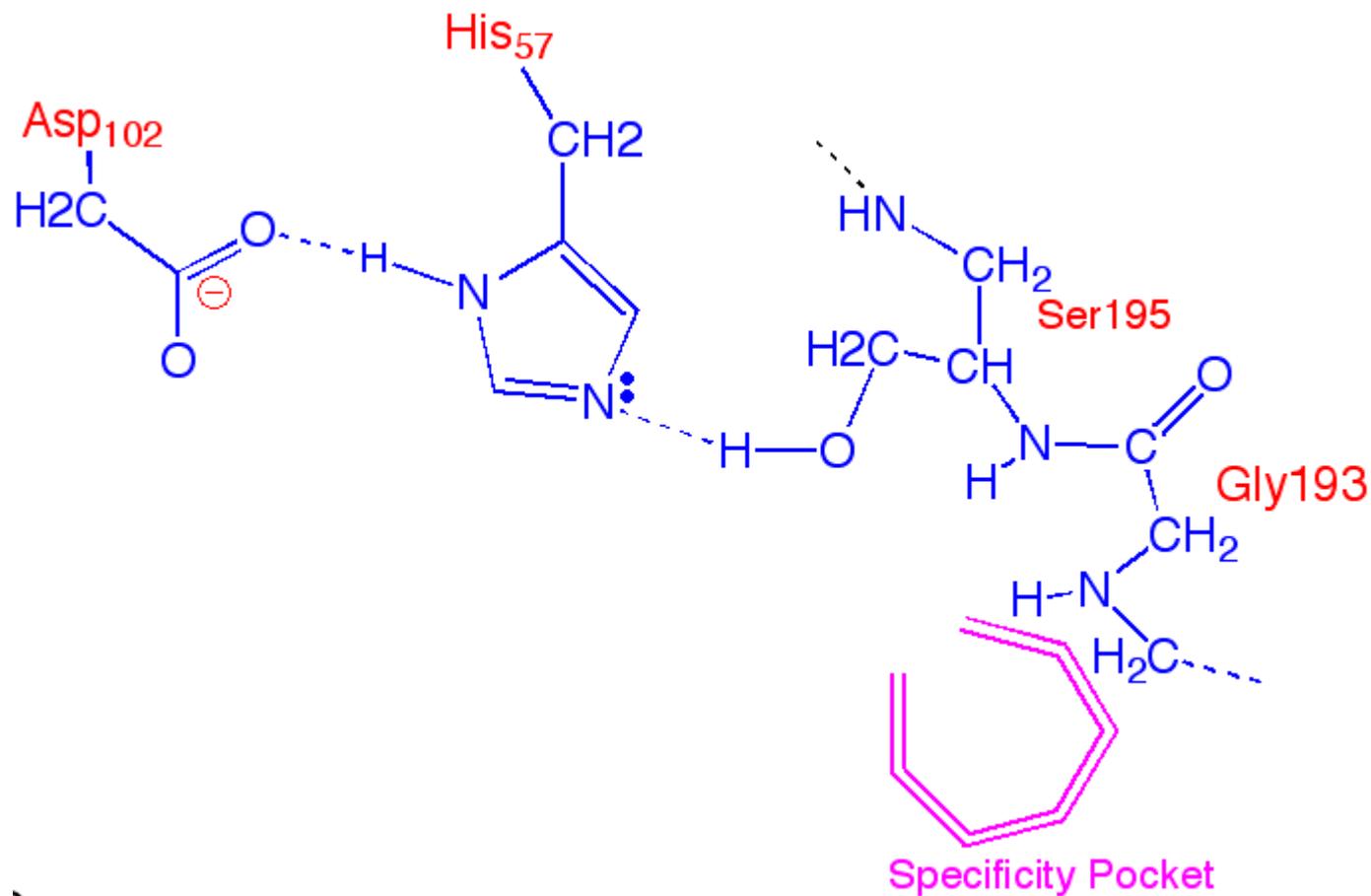
- trigonal planar C=O
- no H bond to C=O
- no H bond to Gly 193

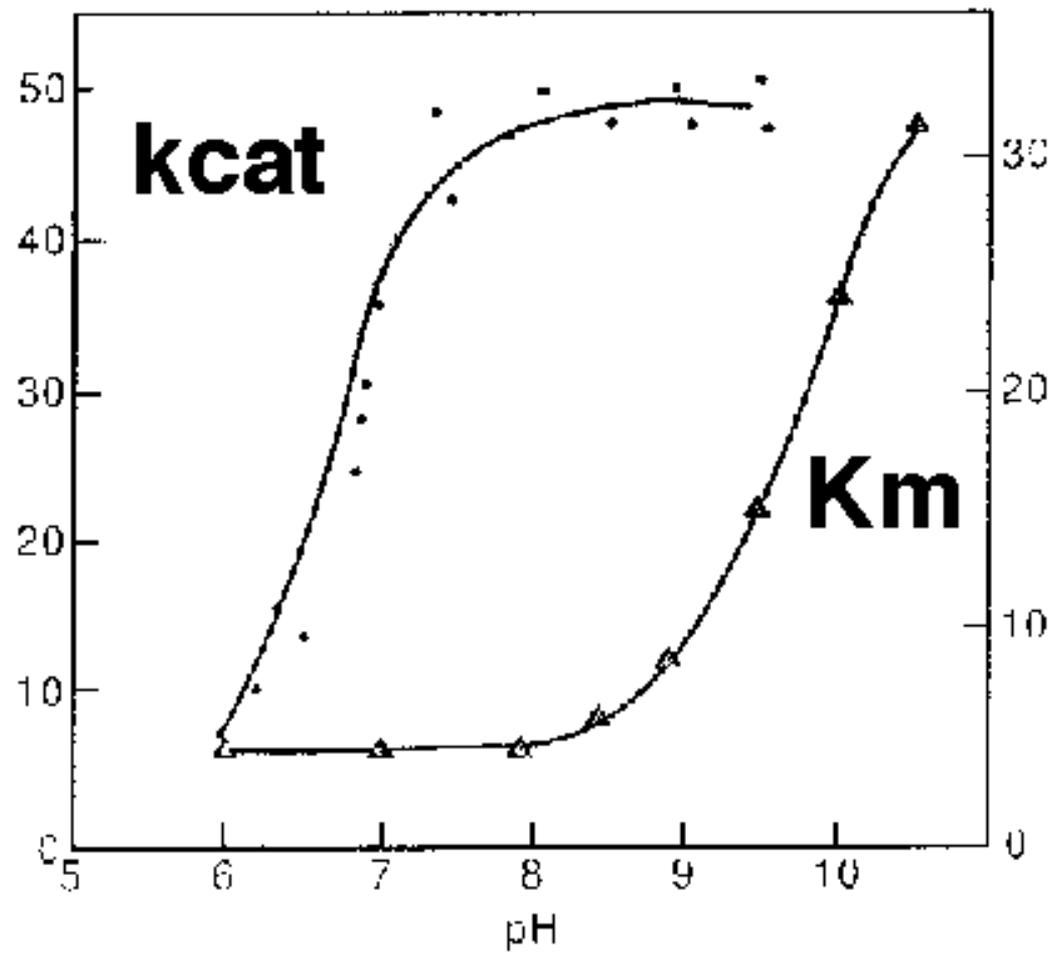


Tetrahedral Intermediate

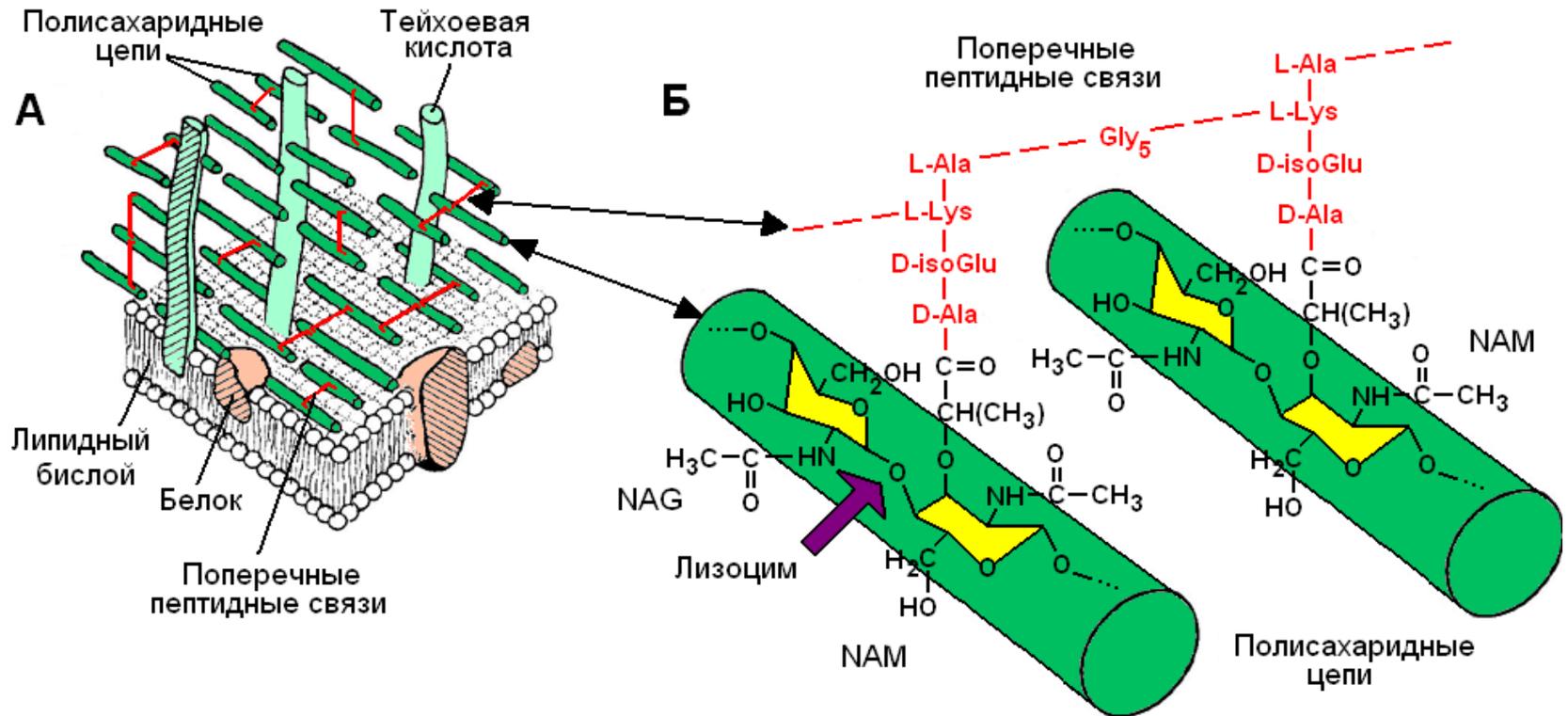
- tetrahedral C
- H bond to O
- H bond to Gly 193

АНИМАЦИЯ МЕХАНИЗМА КАТАЛИЗА ХИМОТРИПСИНОМ

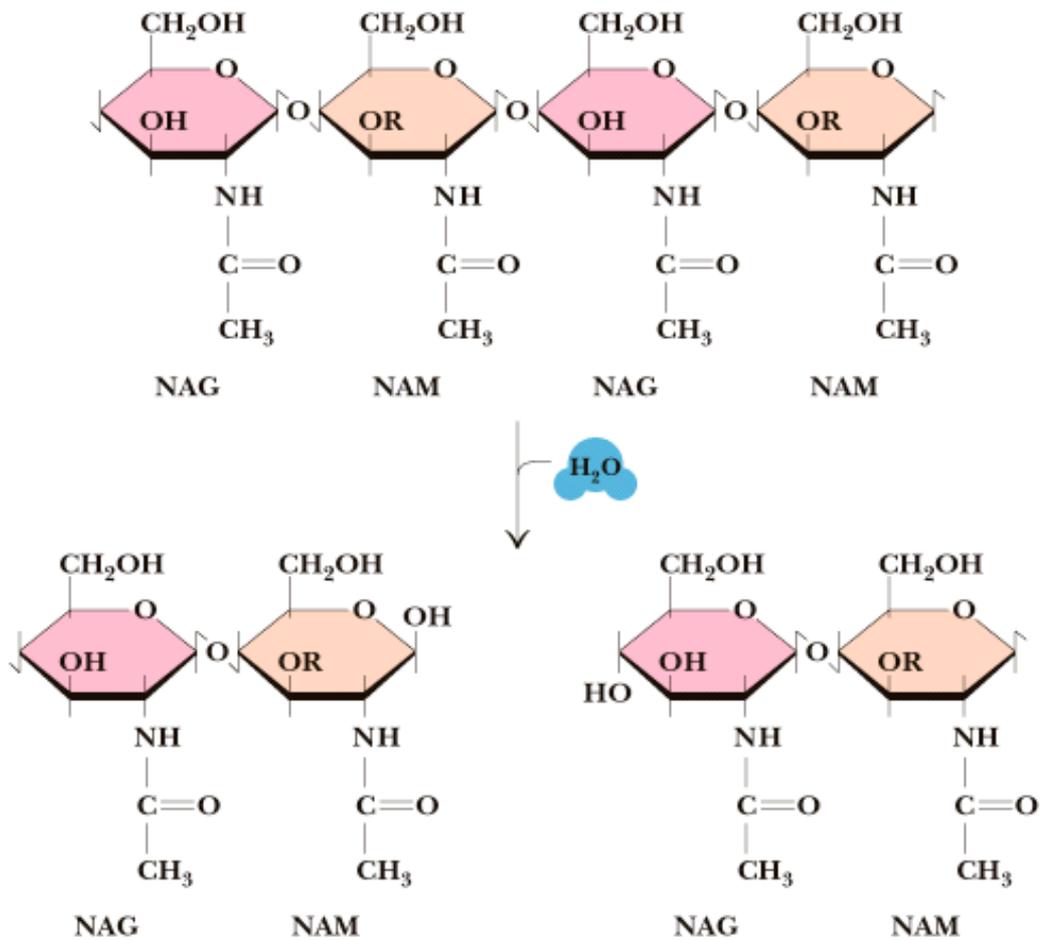




ЛИЗОЦИМ БЕЛКА КУРИНОГО ЯЙЦА – ГИДРОЛИЗ ПОЛИСАХАРИДНОГО ОСТОВА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ БАКТЕРИЙ

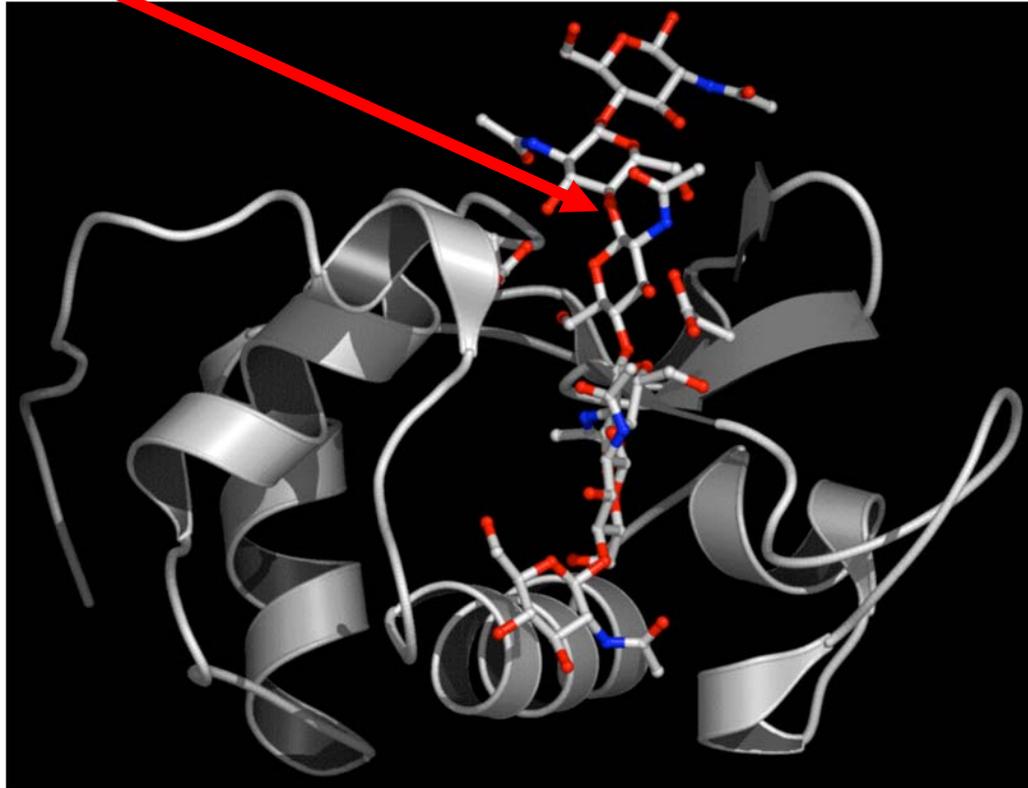


ЛИЗОЦИМ



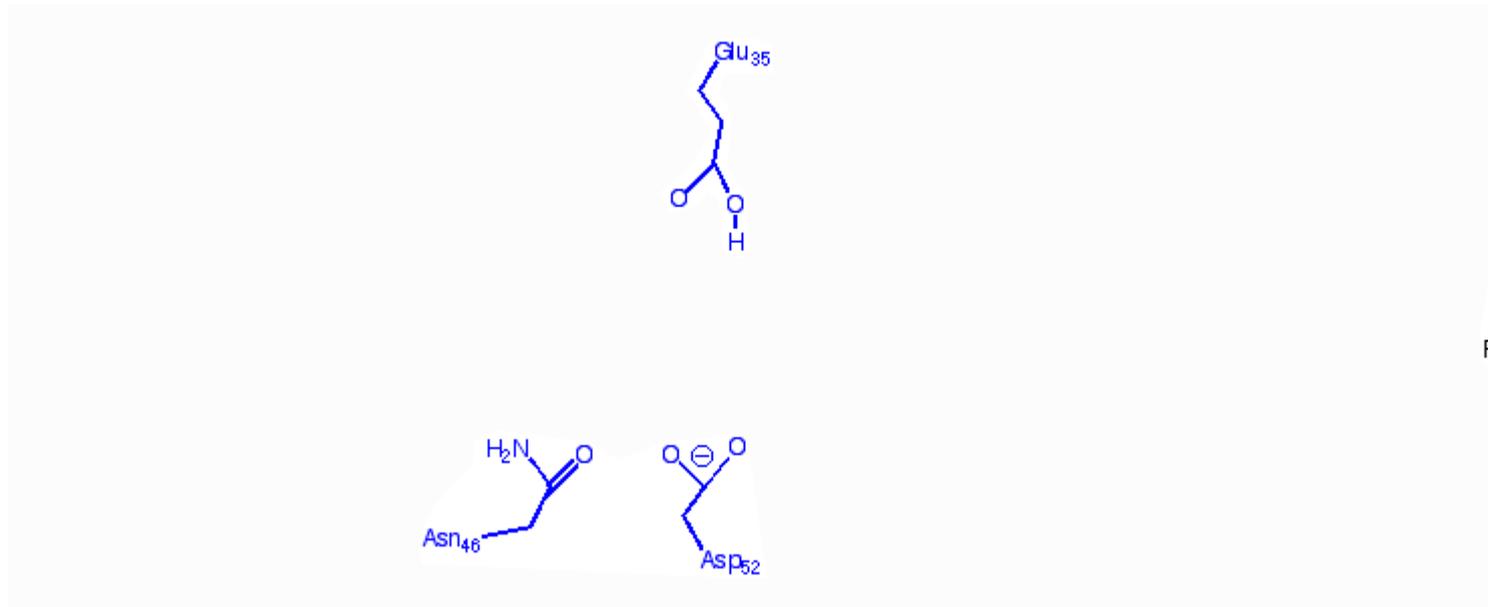
Lysozyme cuts at D-E

F



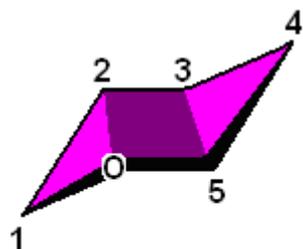
A

АНИМАЦИЯ МЕХАНИЗМА КАТАЛИЗА ЛИЗОЦИМОМ

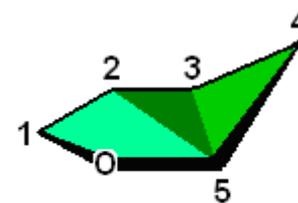


АНАЛОГИ ПЕРЕХОДНОГО СОСТОЯНИЯ СВЯЗЫВАЮТСЯ С ФЕРМЕНТОМ ЛУЧШЕ

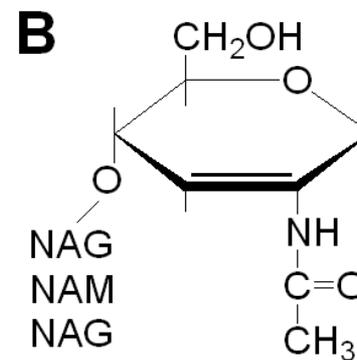
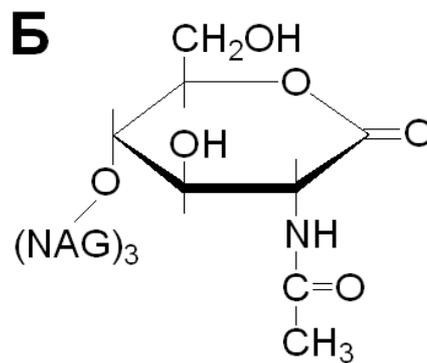
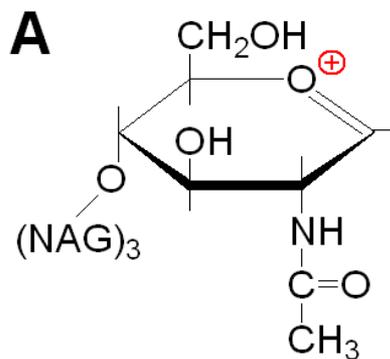
(100 раз)



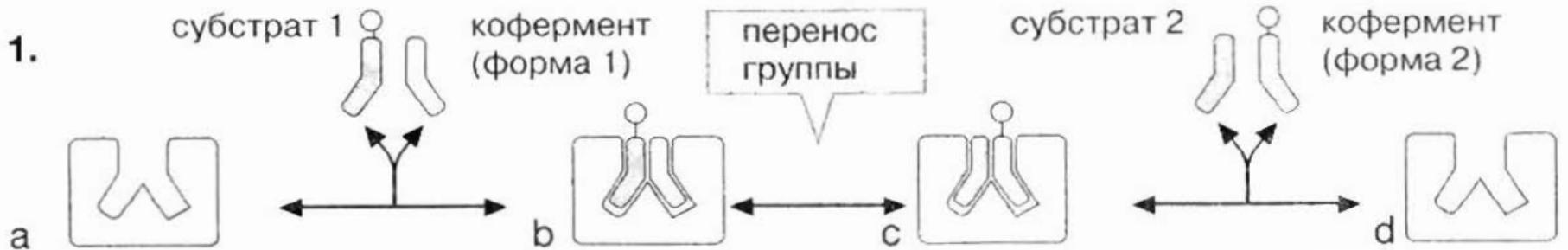
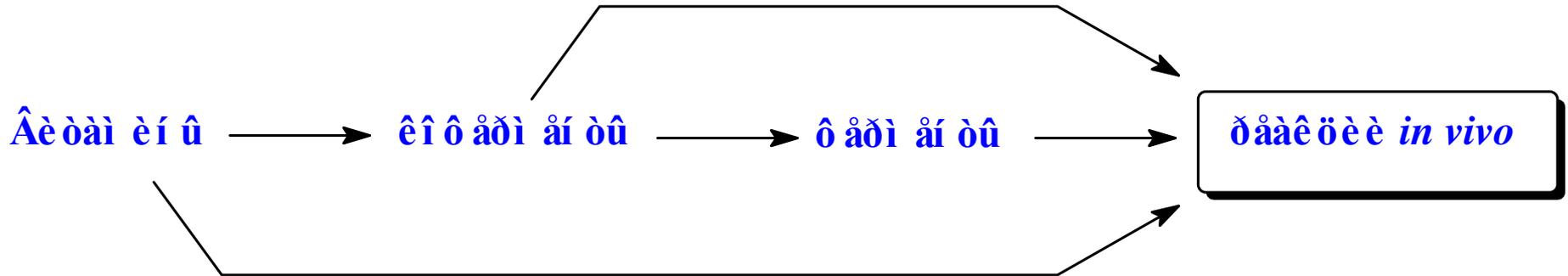
Конформация кресла



Конформация полукресла



ВИТАМИНЫ И КОФЕРМЕНТЫ



Коферменты и витамины

Витамин	Коферментная форма	Тип катализируемой реакции
Водорастворимые витамины		
Тиамин (В ₁)	Тиаминпирофосфат	Декарбоксилирование α -кетокислот
Рибофлавин (В ₂)	Флавиномононуклеотид, флавинадениндинуклеотид	Окислительно-восстановительные реакции
Никотиновая кислота	Никотинамидадениндинуклеотид, никотинамидадениндинуклеотидфосфат	Окислительно-восстановительные реакции
Пантотеновая кислота	Кофермент (коэнзим) А	Перенос ацильных групп
Пиридоксин (В ₆)	Пиридоксальфосфат	Перенос аминогрупп
Биотин (Н)	Биотицин	Перенос CO ₂
Фолиевая кислота	Тетрагидрофолат	Перенос одноуглеродных групп
Витамин В ₁₂	Дезоксиаденозилкобаламин	Перенос связанного с углеродом атома водорода на соседний атом углерода
Аскорбиновая кислота (С)	Не известна	Реакции гидроксирования

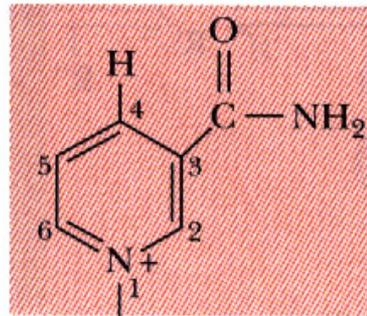
Коферменты и витамины

Витамин	Коферментная форма	Тип катализируемой реакции
Жирорастворимые витамины		
Витамин А	Ретиналь	Зрительный процесс
Витамин D	1,25-Дигидроксихолекальциферол	Регуляция обмена Са
Витамин Е	Не известна	Защита мембранных липидов
Витамин К	Не известна	Реакции декарбоксилирования

Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+

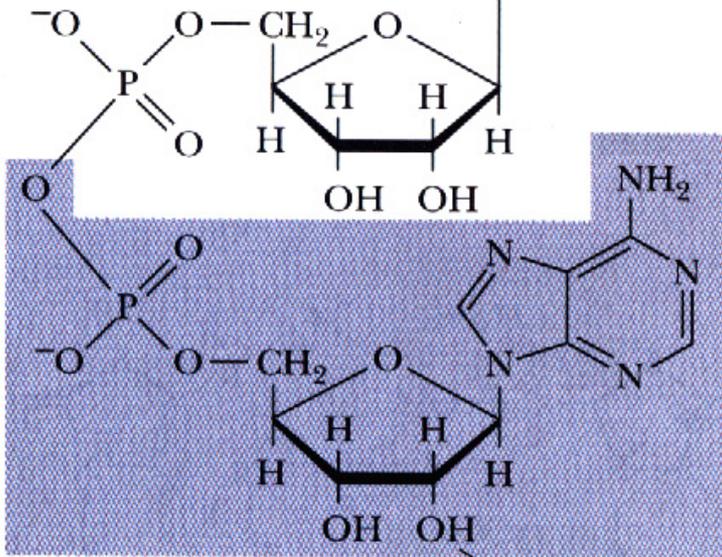
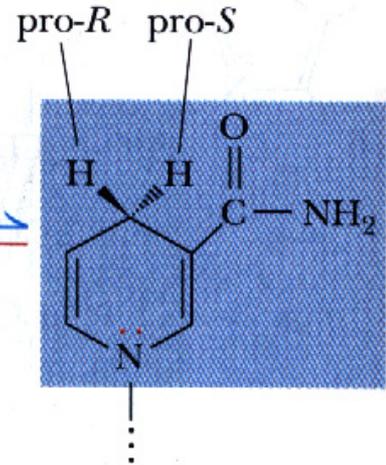
AMP

Nicotinamide
(oxidized form)



Hydride ion,
 H^-

Nicotinamide
(reduced form)



NADP^+ contains a **P**
on this 2'-hydroxyl

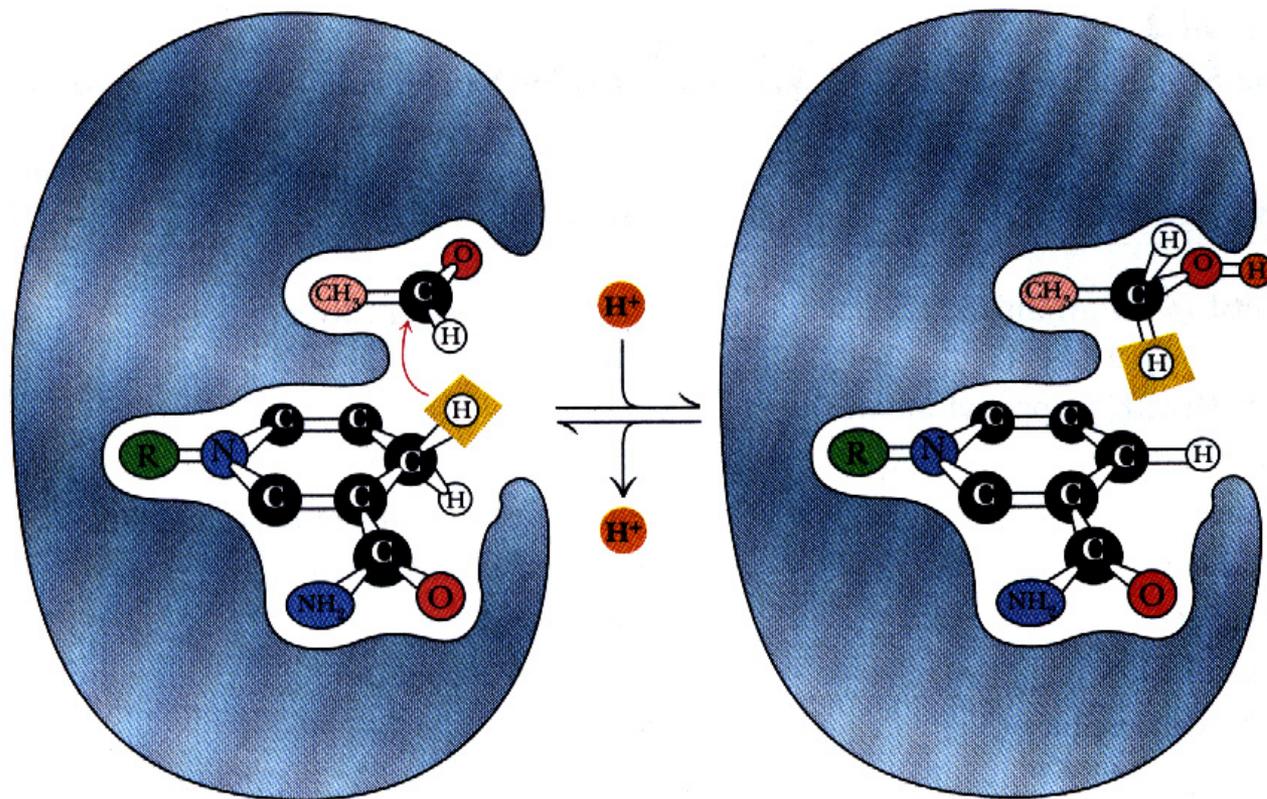
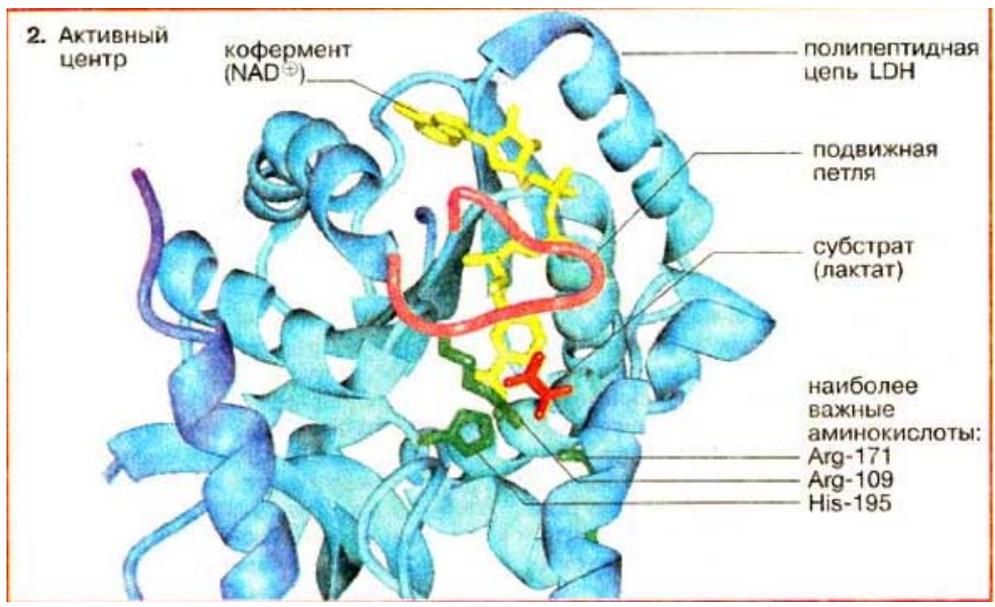
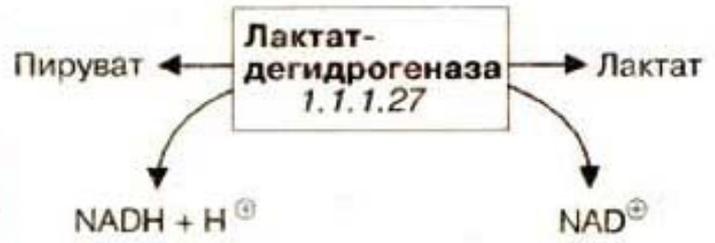
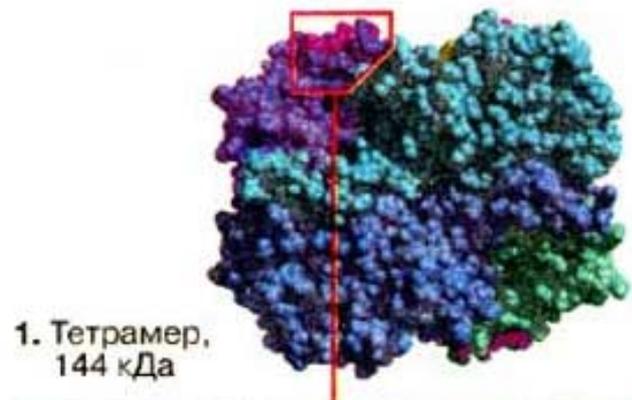


Figure 14.10 The stereospecificity of hydride transfer in dehydrogenases is a consequence of the asymmetric nature of the active site.



ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА

ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА - СВЯЗЫВАНИЕ С КОФЕРМЕНТОМ ВЫЗЫВАЕТ ДВИЖЕНИЕ ПЕТЛИ

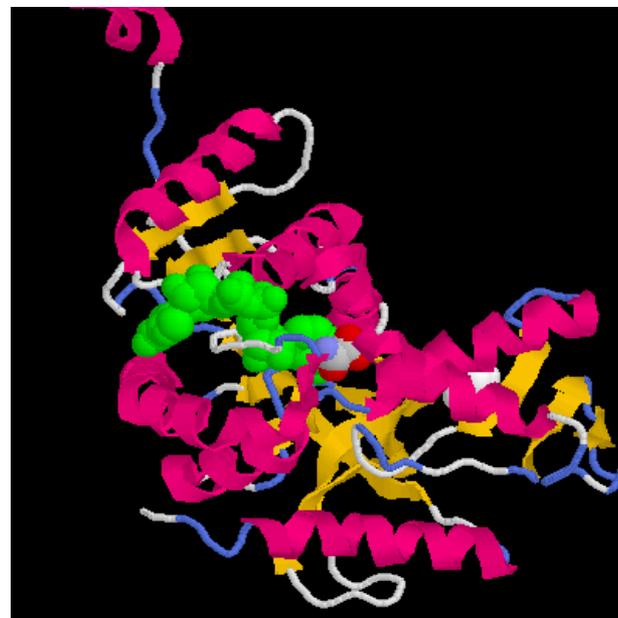
Binding of either NAD⁺ or NADH to the enzyme causes a major

structural rearrangement of the protein: movement of the loop

ApocLDH (1ldb)

between two of the β strands.

LDH+NAD+oxamic acid (1ldm)
CC(=O)C(O)N



Факторы, определяющие каталитическую эффективность ферментов

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

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.**

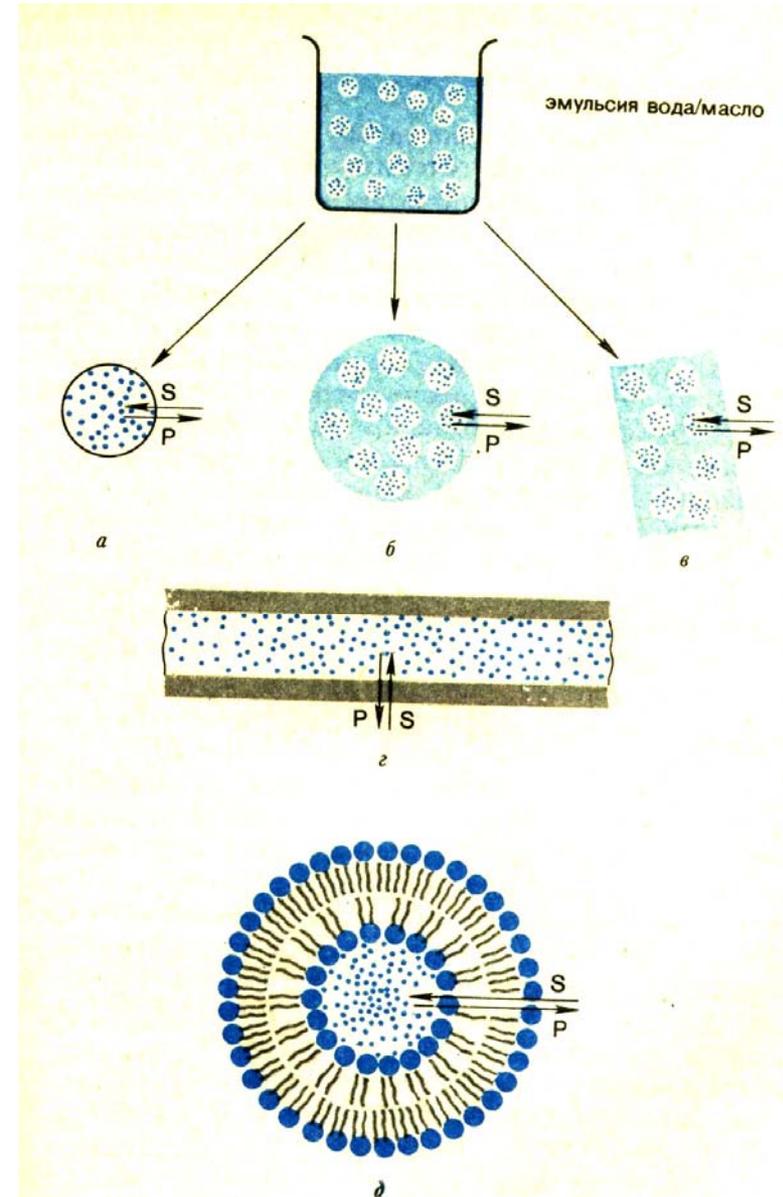
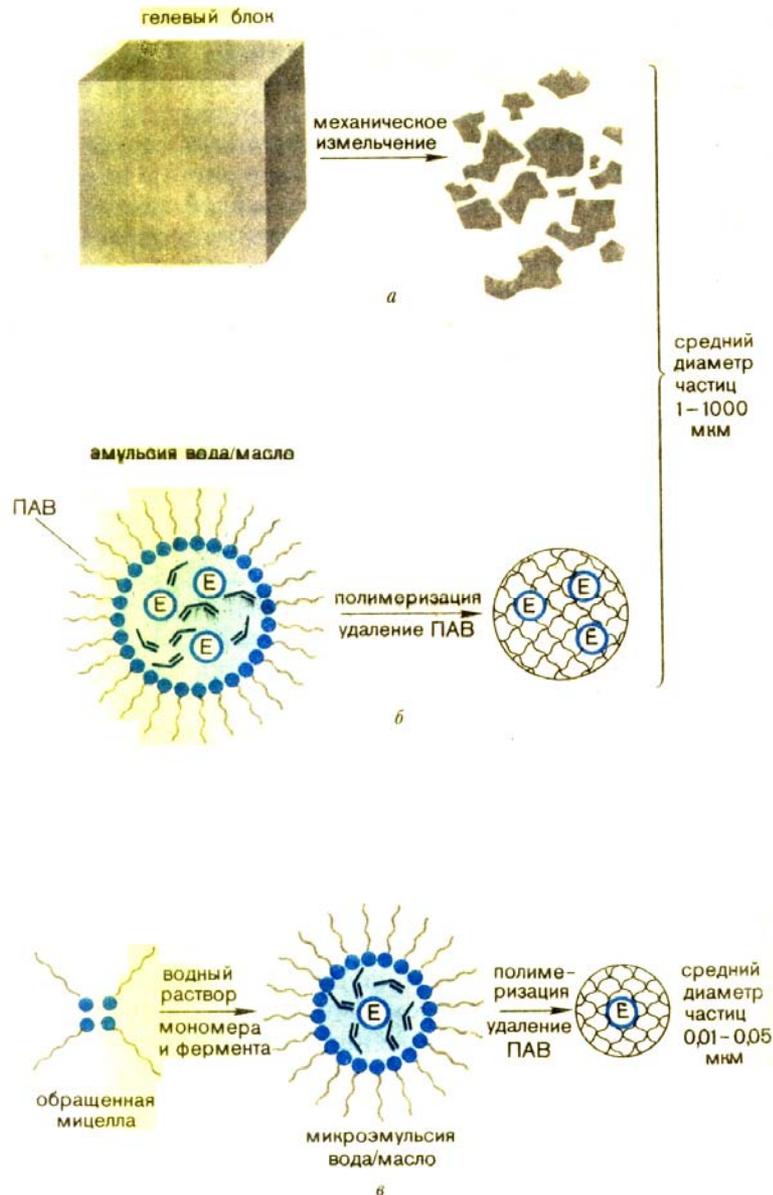
Преимущества иммобилизованных ферментов

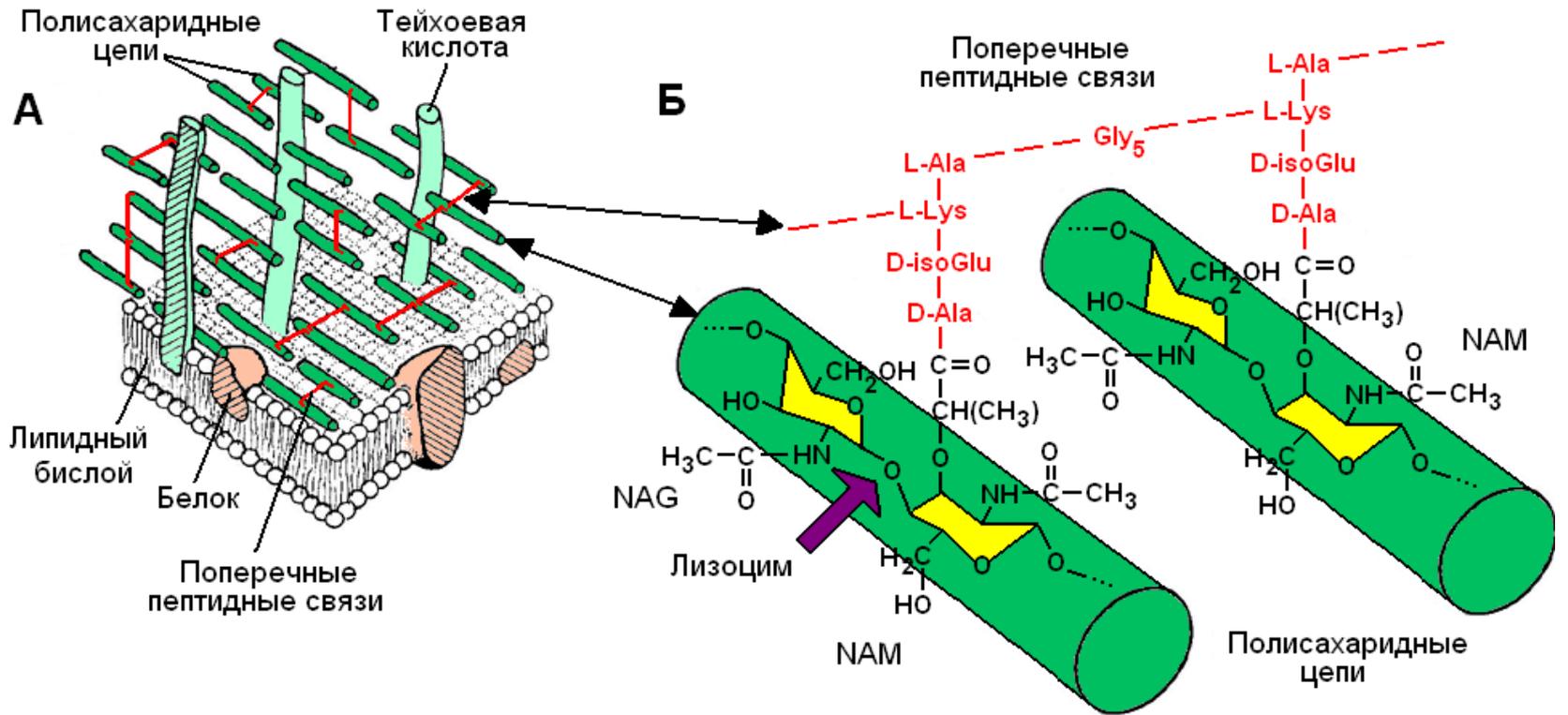
- **ТЕХНОЛОГИЧНОСТЬ**
- **ПРОСТОТА МАНИПУЛЯЦИЙ**
- **ПОВЫШЕННАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ**
(ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ ПРИ
ХРАНЕНИИ)

Недостатки иммобилизованных ферментов

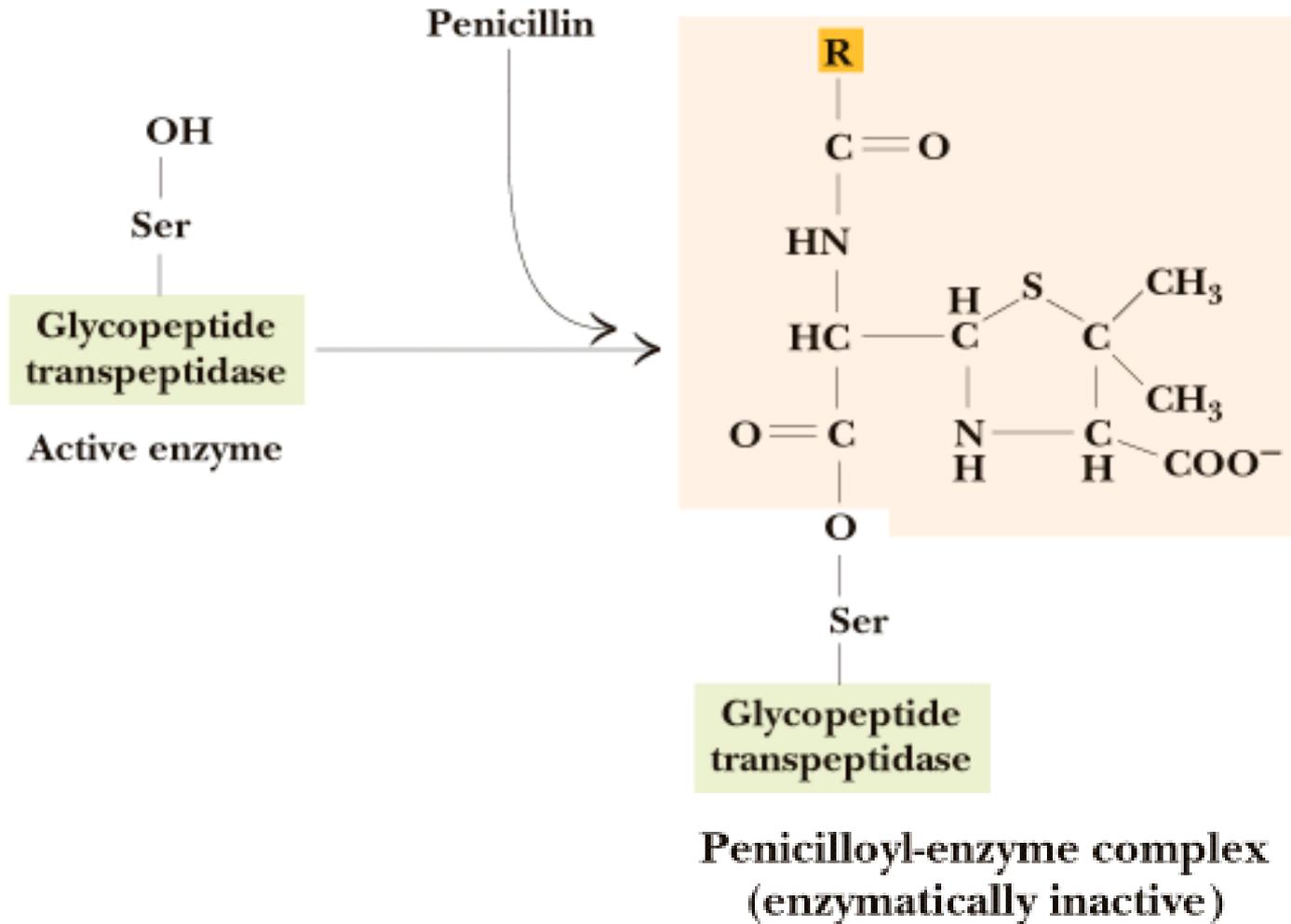
- **ПОНИЖЕННАЯ КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ**
- **ИЗМЕНЕННАЯ СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧЕОСТЬ**
- **ДИФФУЗИОННЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ**

Гранулирование и капсулирование



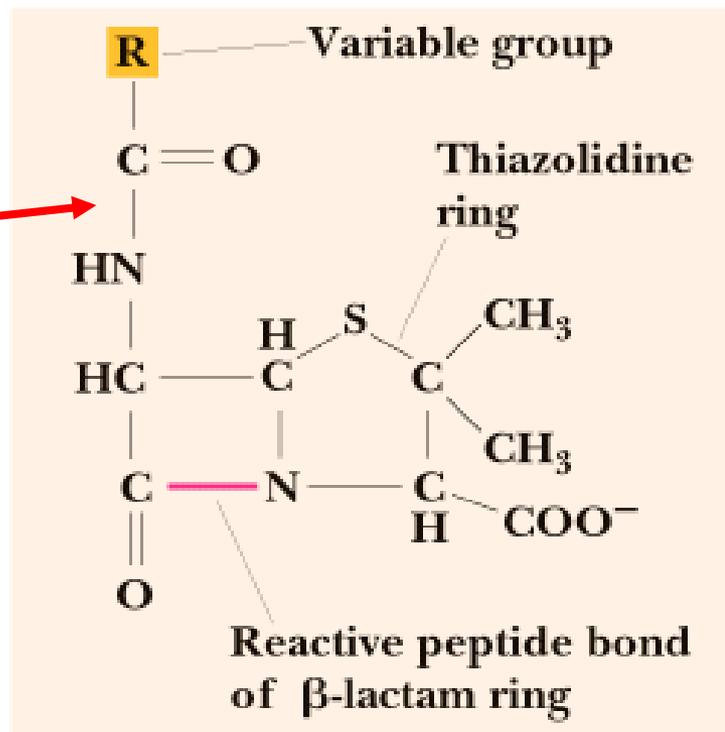


ПЕНИЦИЛЛИН НЕОБРАТИМО ИНГИБИРУЕТ ФЕРМЕНТ, «УПРОЧНЯЮЩИЙ» КЛЕТОЧНУЮ СТЕНКУ БАКТЕРИЙ

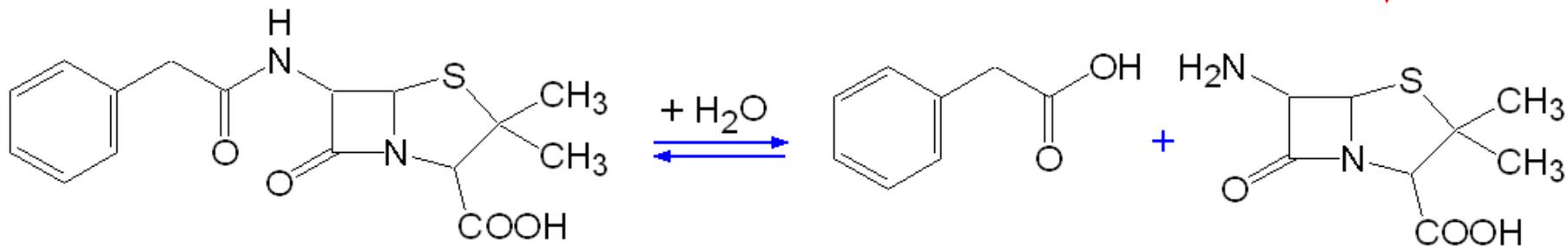


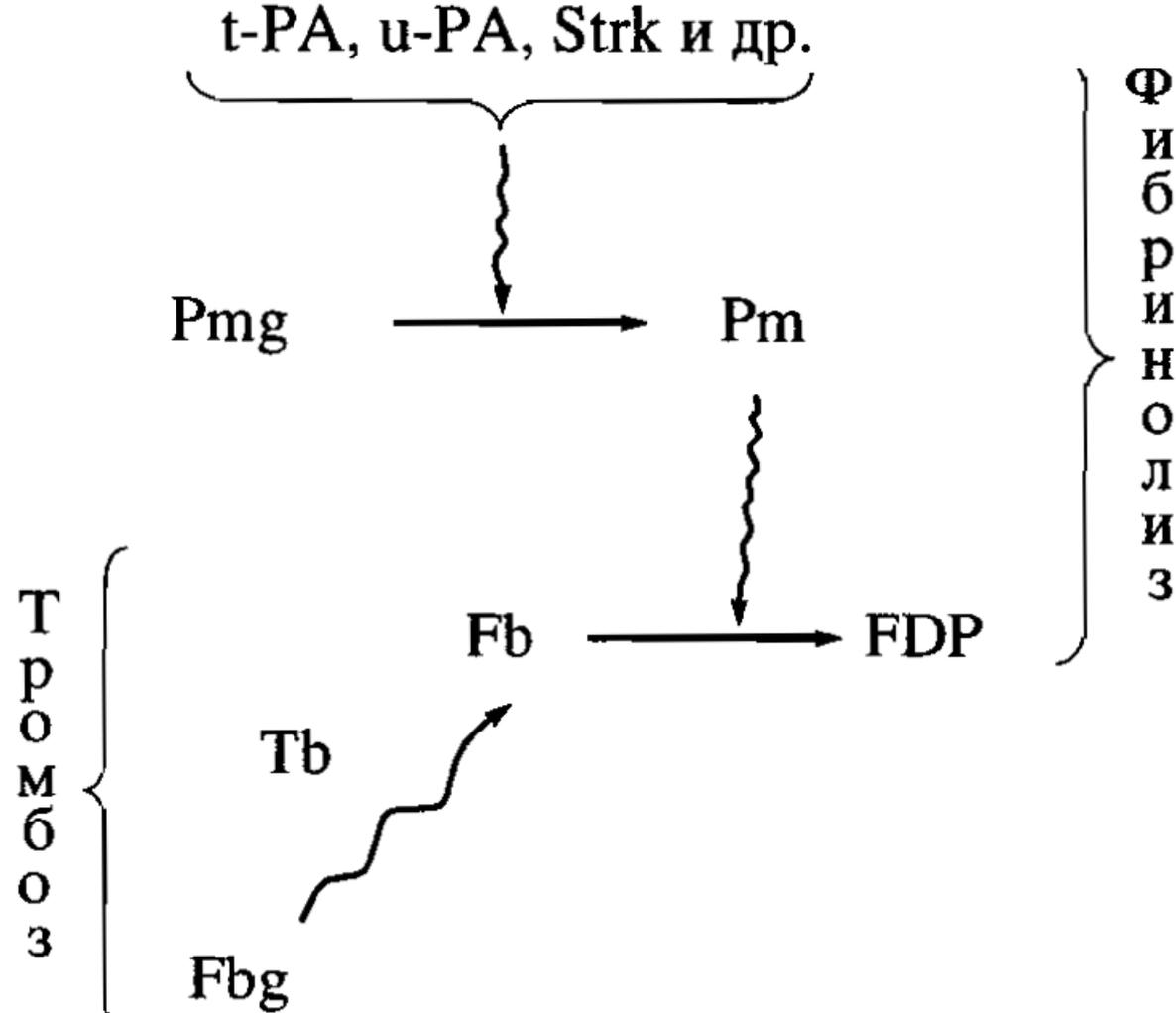
ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗА

Пенициллинацилаза



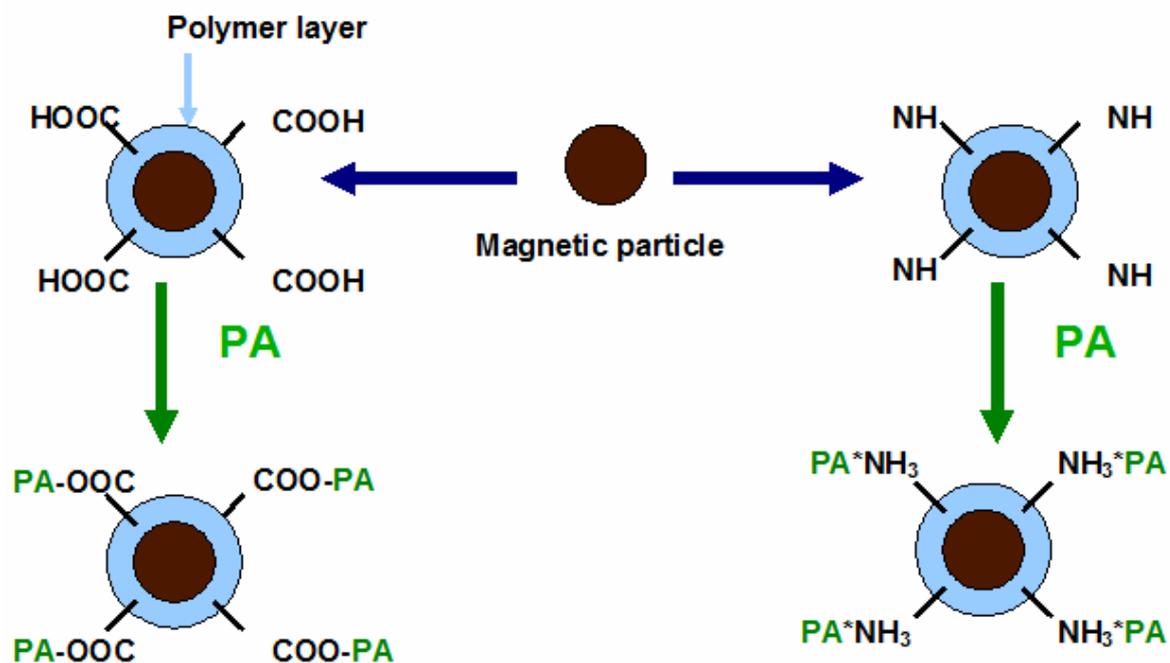
6-АПК – полупродукт в синтезе антибиотиков





Упрощенная схема фибринолитических превращений при активации плазминогена его активаторами. Обозначения: t-PA и u-PA – активаторы плазминогена тканевого и урокиназного типа, Strk – стрептокиназа, Pmg – плазминоген, Pm – плазмин, Fbg – фибриноген, Fb – фибрин, FDP – продукты деградации фибрина, Tb – тромбин.

АТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА (Pm-SK) НА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ

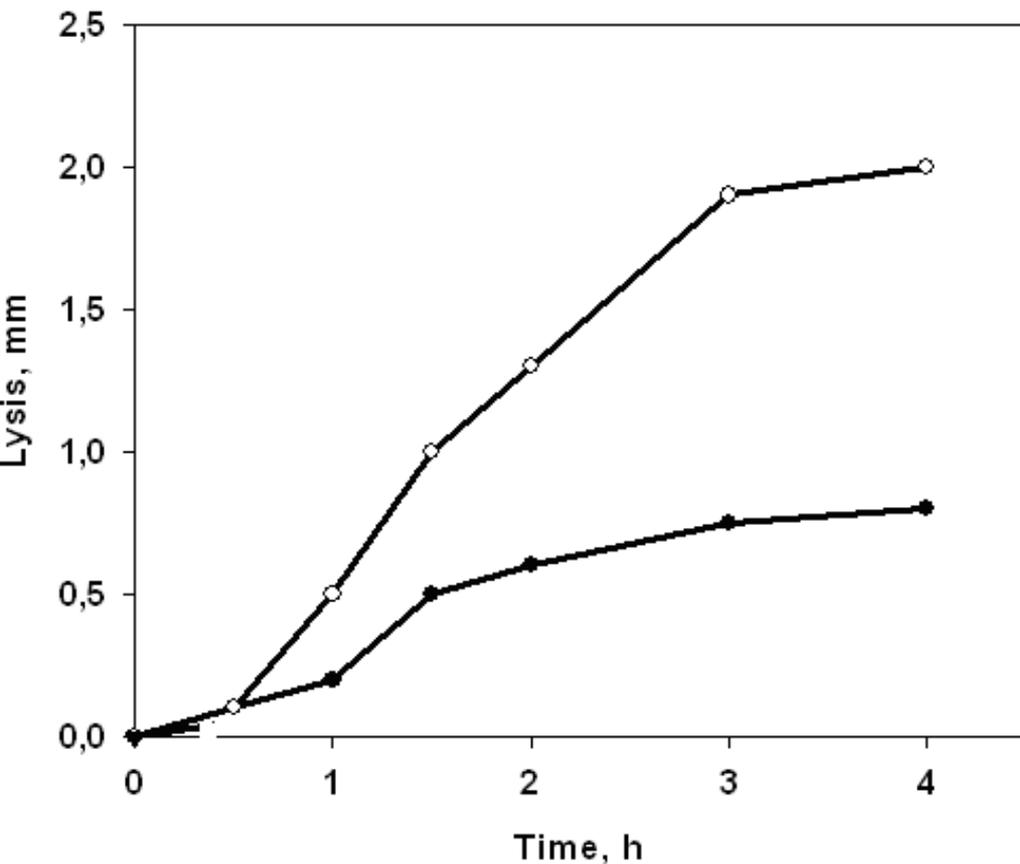
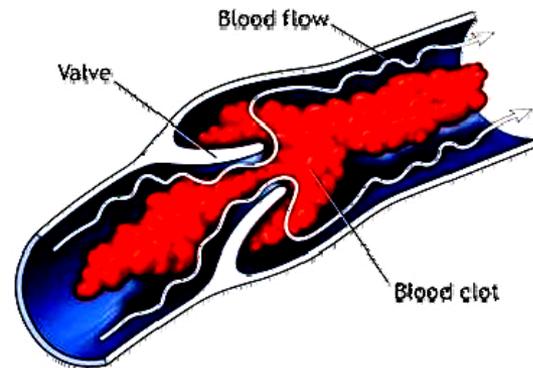


Р.Б.Айсина и др.

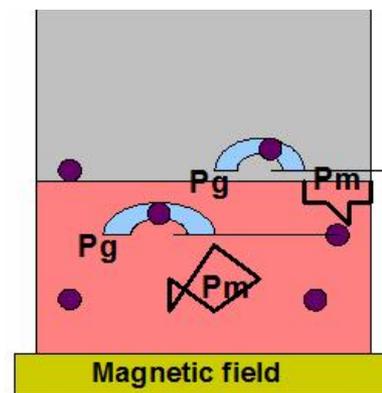
АТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА (Pm-SK) НА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ

Эффективный тромболитический агент

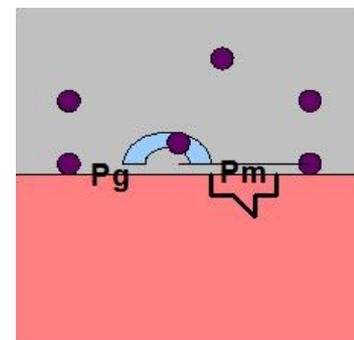
Фибринолитическая активность (лизис фибринового сгустка)



Магнитное поле



Нет магнитного поля



Р.Б. Айсина и др.

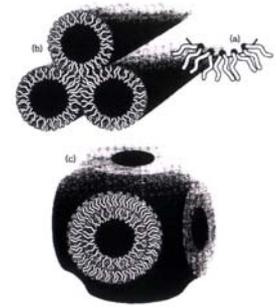
Белки (ферменты) и др. биологически активные соединения в естественных условиях

Функционируют, в основном, на/около межфазной поверхности типа «вода/ органический растворитель»

Функционируют в областях с ограниченной подвижностью, с высокой степенью компартментализации

Контактируют или взаимодействуют с другими белками, липидами, полисахаридами (условия «краудинга»)

ПОЛИМОРФИЗМ ЛИПИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ



⌘ Biological membranes are predominantly arranged as bilayers

⌘ Some lipid components spontaneously form non-lamellar phases:

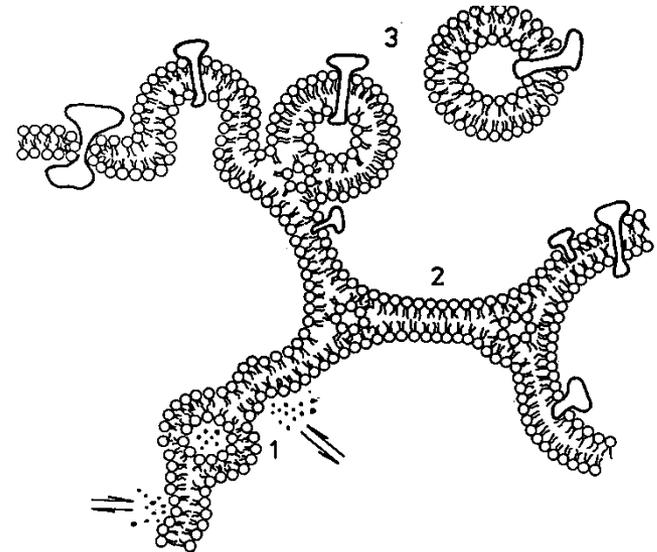
⌘ Inverted hexagonal phase

⌘ Cubic phases (inverted micellar and bicontinuous)

⌘ Micellar phases (normal and inverted)

⌘ Some peptides, proteins, or Ca^{2+} binding can induce or facilitate the formation of non-lamellar phases

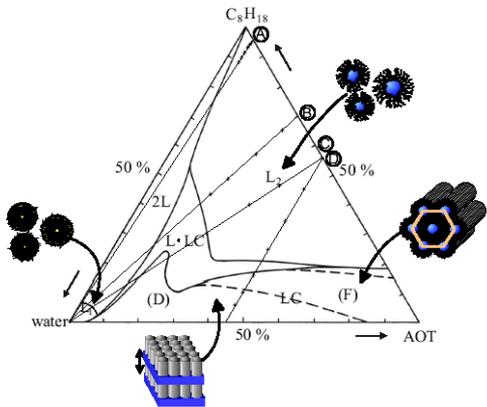
⌘ Non-lamellar-forming lipids play a role in modulation of the activity of proteins (enzymes) (rhodopsin, protein kinase C, etc., membrane curvature is important)



Metamorphic mosaic model of biological membrane

P.R.Cullis, B.de Kruijff et al. (1980)

ОПИСАНИЕ СИСТЕМЫ

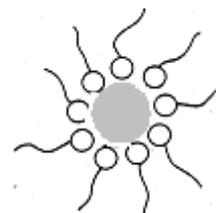
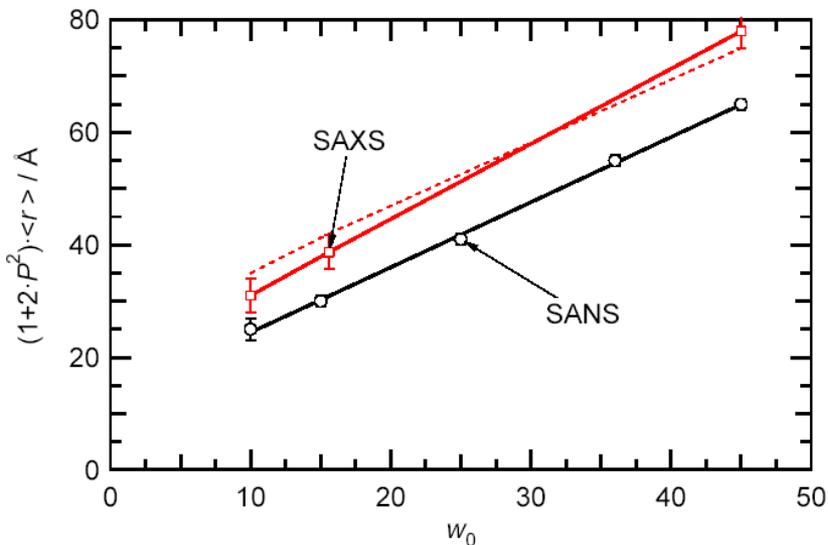


Radius is in nano-scale,
changes linearly with
water content

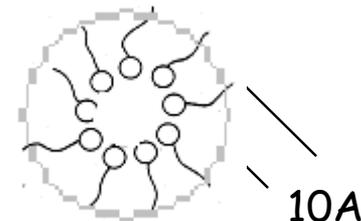
Particle size
distribution is narrow

✘ Не удается отобразить рисунок. Возможно, рисунок повреждали недостаточно памяти для его открытия. Перезагрузите компьютер, а затем снова откройте файл. Если вместо рисунка все еще отображается красный крестик, попробуйте удалить рисунок и вставить его заново.

Uniform in size and shape



SANS



SAXS

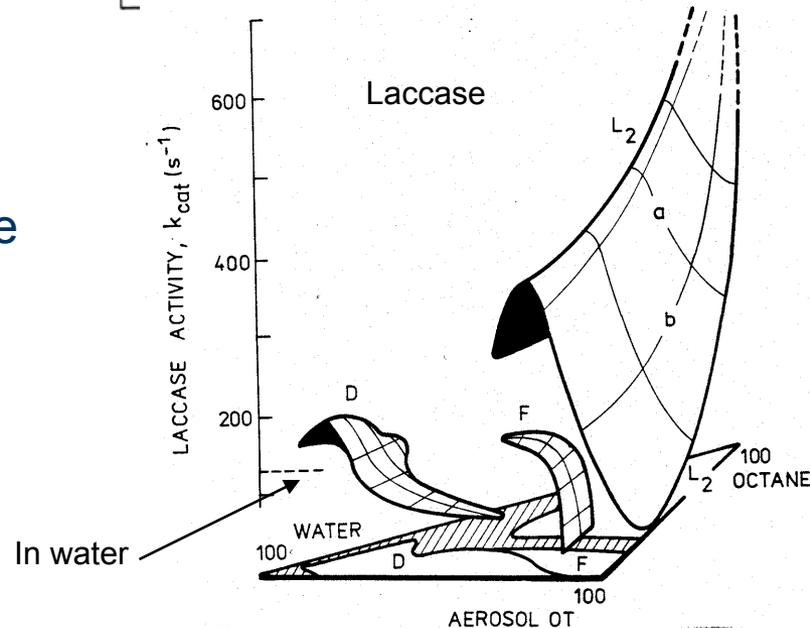
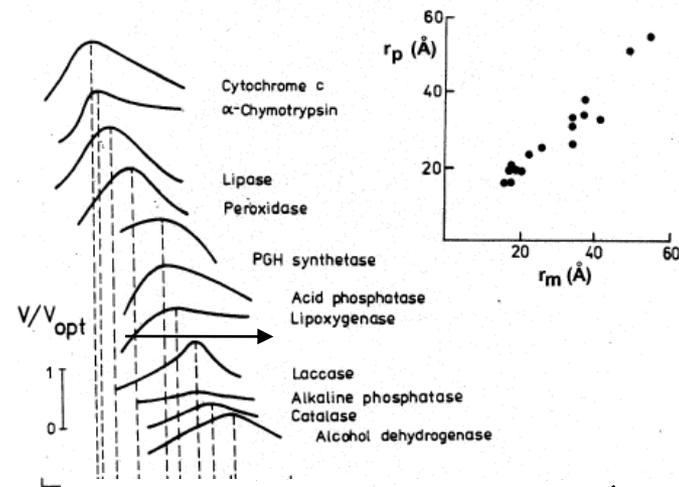
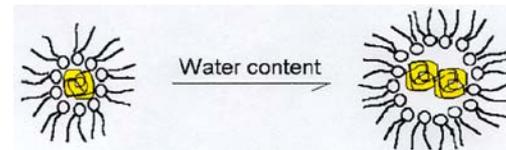
ОСНОВНЫЕ ПРЕИМУЩЕСТВА СИСТЕМЫ

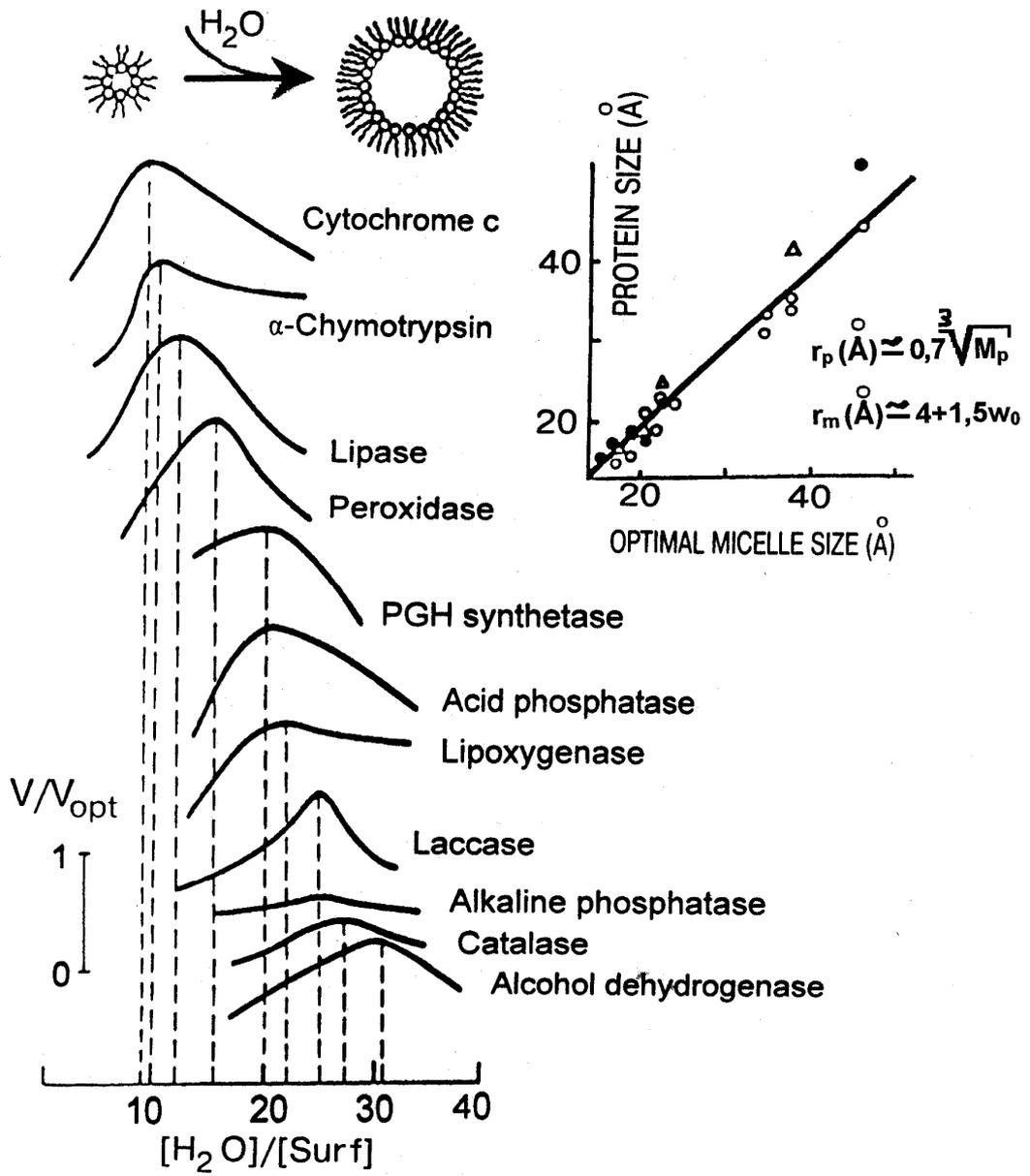
Матрица наноразмеров играет ключевую роль в функционировании ферментов (определяет поведение фермента)

Выявлены свойства, которые сложно или невозможно проверить в водных растворах:

1. Проявление ферментом суперактивности
2. Регуляция структуры, активности и стабильности (диссоциация на активные субъединицы и/или ассоциация в надмолекулярные комплексы, в том числе, между несколькими белками)
3. Проявление рядом ферментов «мембраночувствительности» и возможностей регуляции

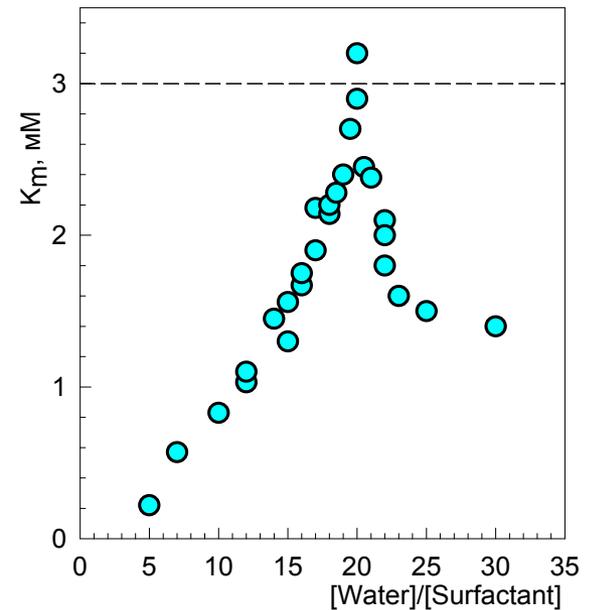
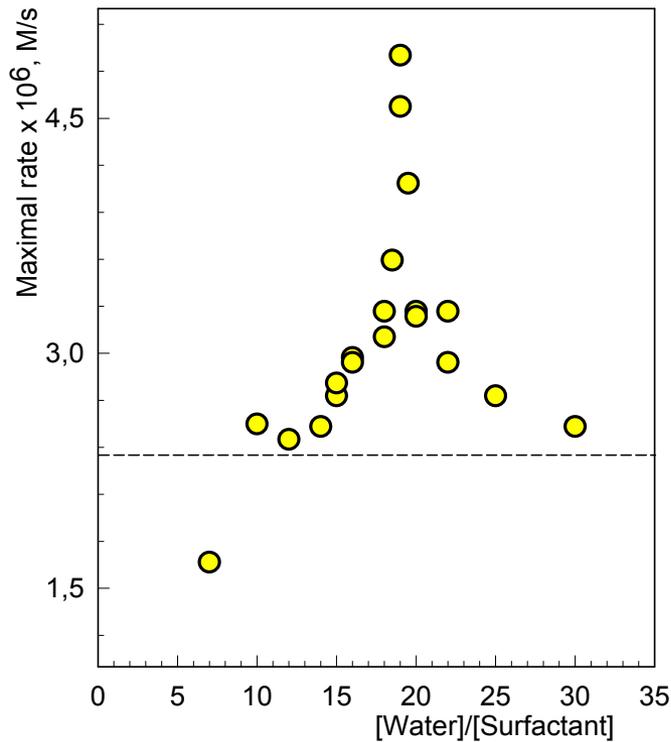
Более 30 ферментов
разных классов



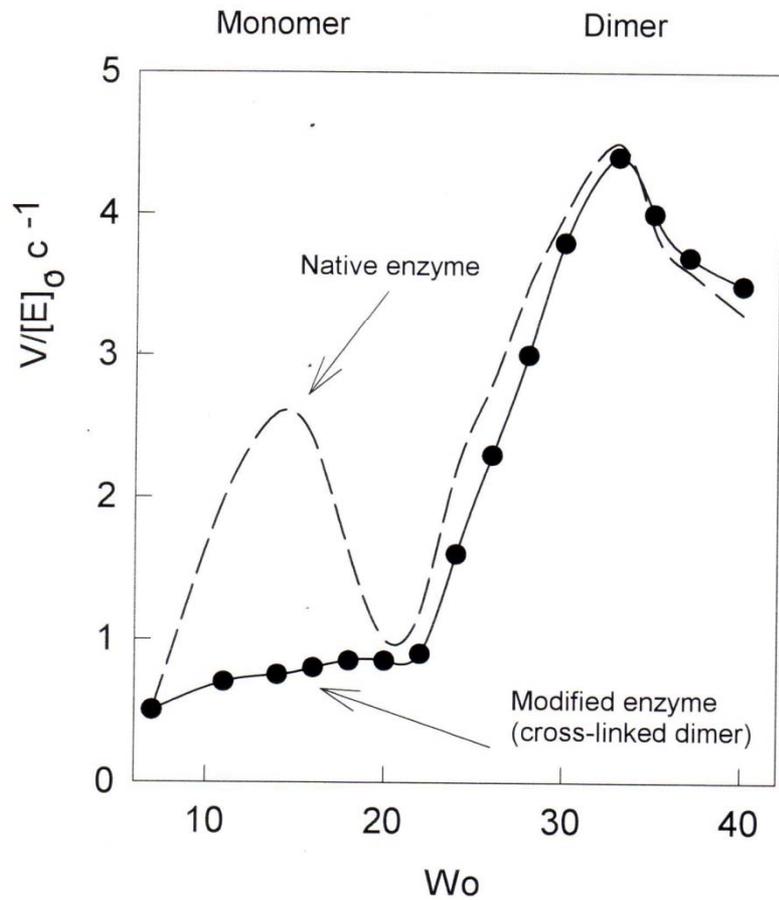


β-ГЛЮКОЗИДАЗА ИЗ СЛАДКОГО МИНДАЛЯ: РЕГУЛЯЦИЯ В ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛАХ

Enhancement of the efficiency of the catalysis in an expense of binding
(active site rigidity increasing)



FORMATE DEHYDROGENASE IN REVERSE MICELLES: REGULATION OF THE ENZYME CATALYTIC ACTIVITY AND THE PROTEIN OLIGOMERIC COMPOSITION



МАНИПУЛЯЦИИ С СИСТЕМОЙ И ВОЗМОЖНОСТИ НАПРАВЛЕННОГО ИЗМЕНЕНИЯ СВОЙСТВ:

ВНЕШНИЙ РАСТВОРИТЕЛЬ (вязкость)

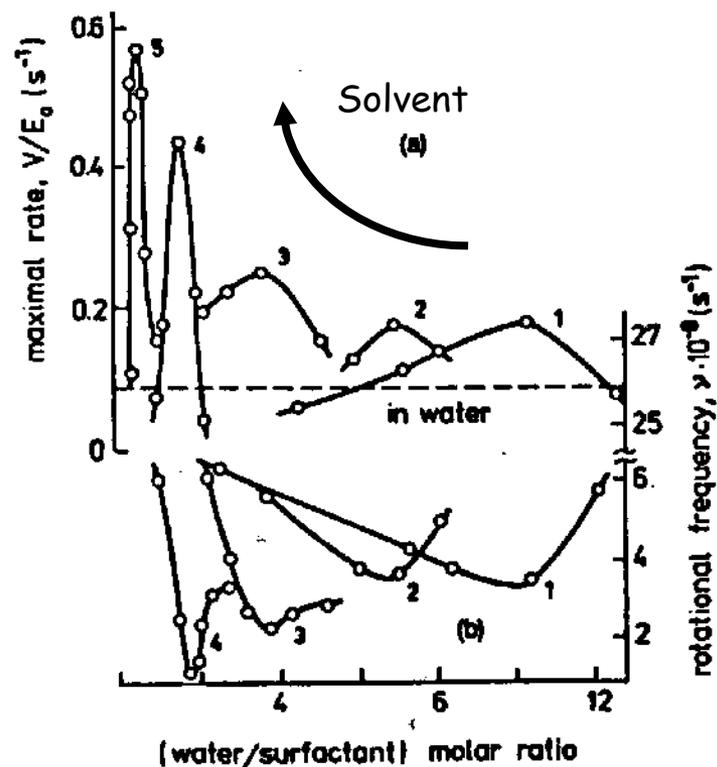
МЕМБРАННЫЙ СЛОЙ (полимеризация)

ВНУТРЕННЯЯ ПОЛОСТЬ

(смешивающиеся с водой органические растворители, полиэлектролиты, желатин, полимеризация)

ФЕРМЕНТ (гидрофобизация, гидрофилизация, конъюгаты с полимерами)

ВНЕШНИЕ ЭФФЕКТОРЫ (особенности влияния давления, например)

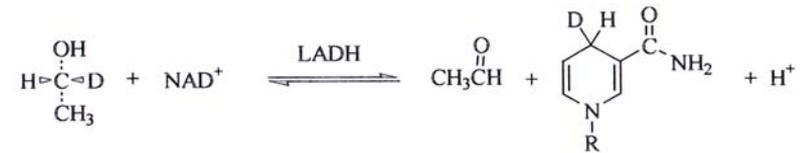
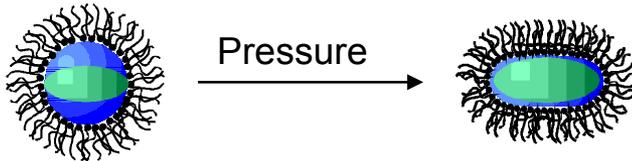


HLADH ACTIVITY UNDER PRESSURE APPLICATION

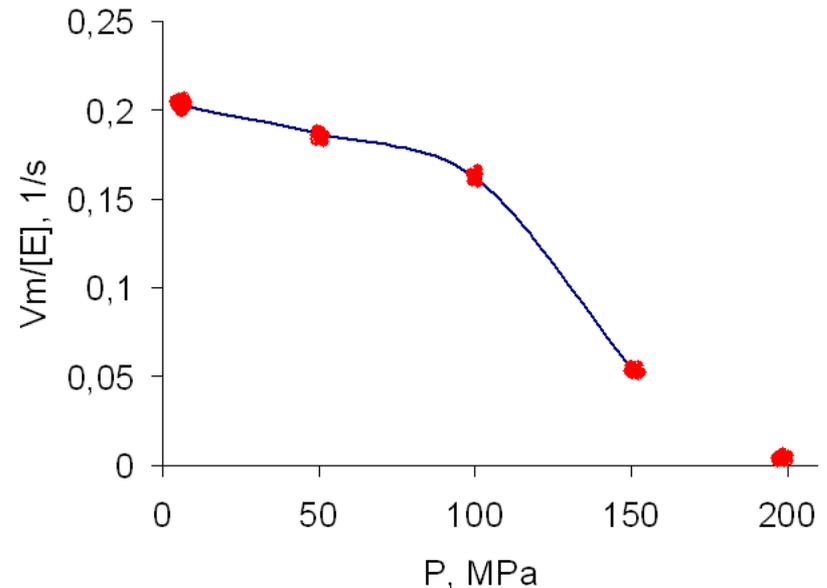
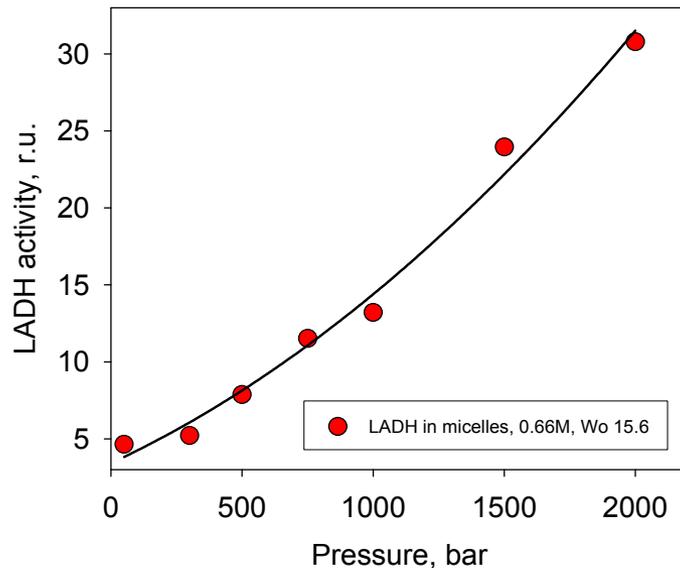


45x55x110 Å

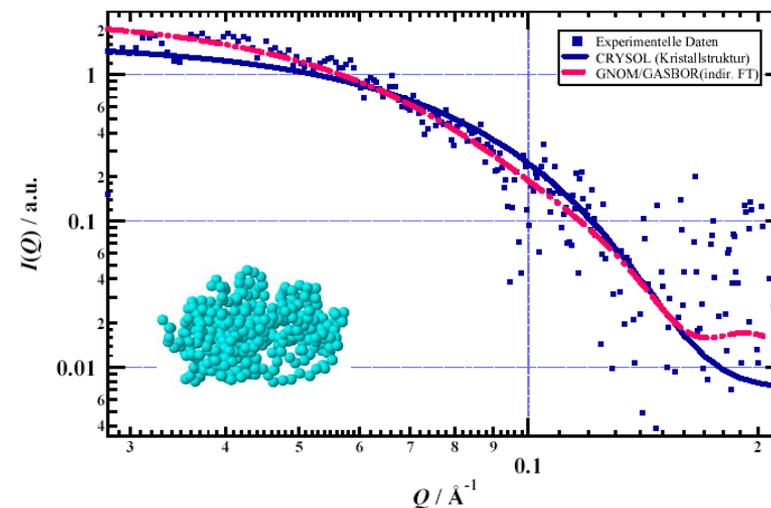
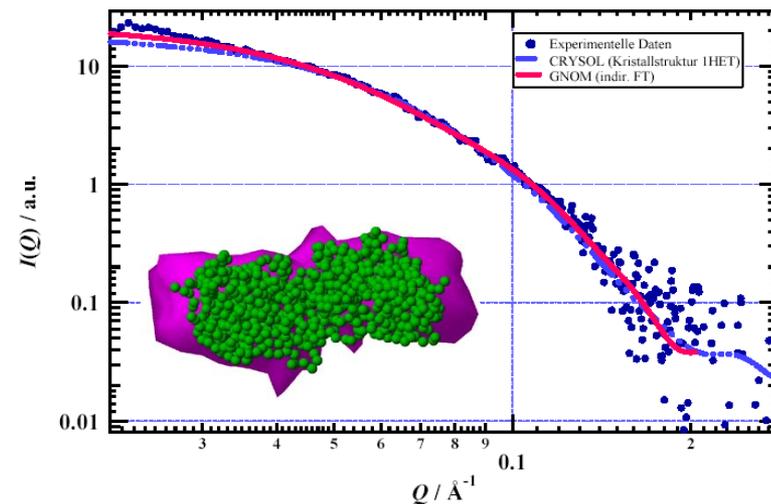
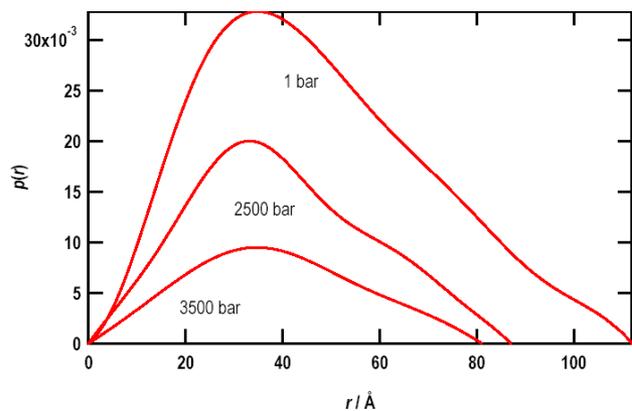
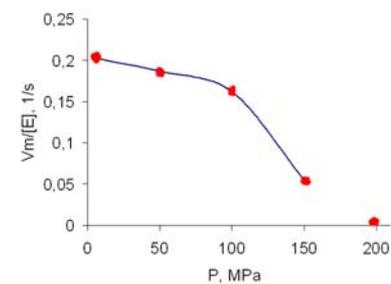
WORKING WITH BIOACTIVES, ONE HAS TO TAKE INTO ACCOUNT THAT *IN VIVO* CONDITIONS ARE NOT AN AQUEOUS CONDITIONS: THE RESULTS CAN BE DIFFERENT FROM THOSE EXPECTED



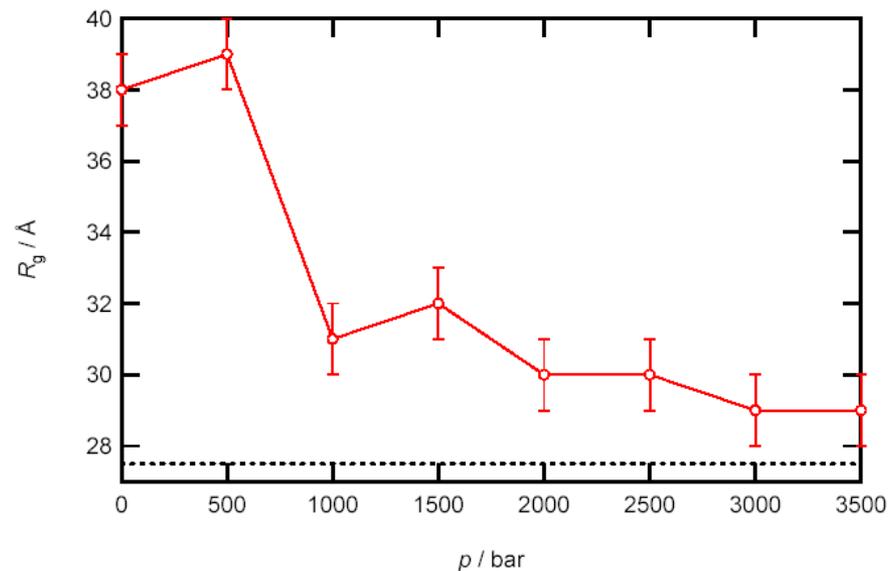
In water

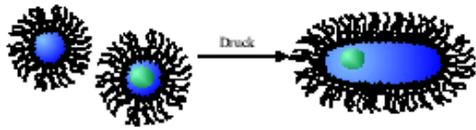


SAXS STUDY OF HLADH IN WATER AT DIFFERENT PRESSURES

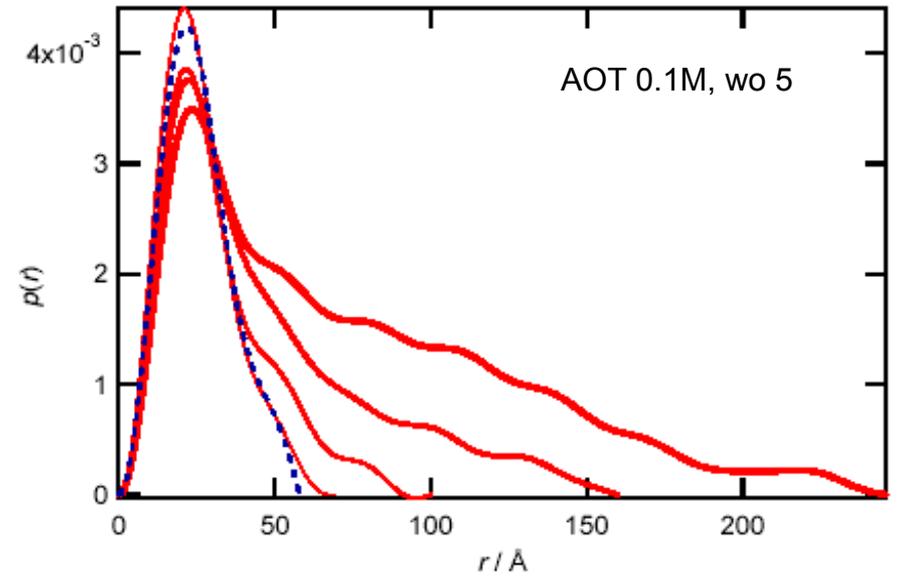
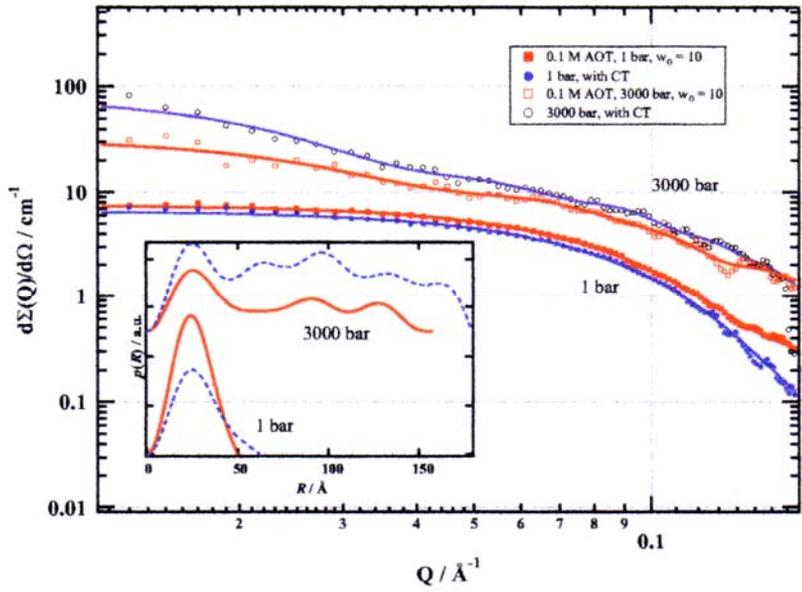
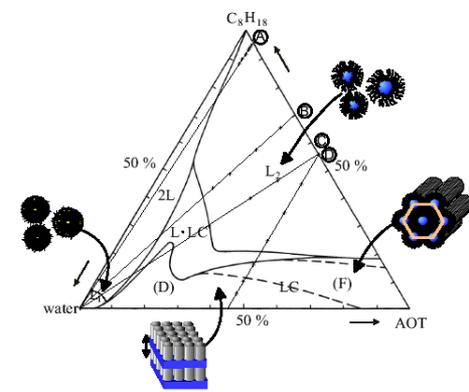


pH 8.5, 25°C



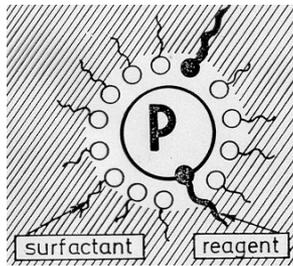


MICELLES CHANGE SHAPE UNDER PRESSURE

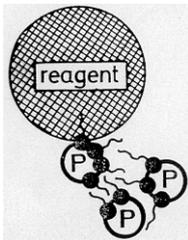


- Slope changes observed on the scattering intensity profile upon pressure application (SANS, SAXS)
- Pair distance distribution (Fourier transform) at normal pressure is typical for spherical particles bell-shaped curve (size distribution is narrow at certain hydration degree)
- Pair distance distribution changes upon pressure increasing
 - Broadening
 - Tail is appeared (not symmetrical profile) (elongation of the particles, 2 stacked micelles)

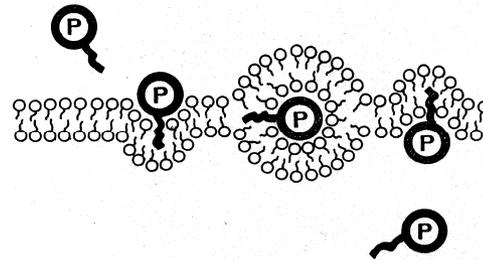
MANIPULATIONS WITH THE ENZYME



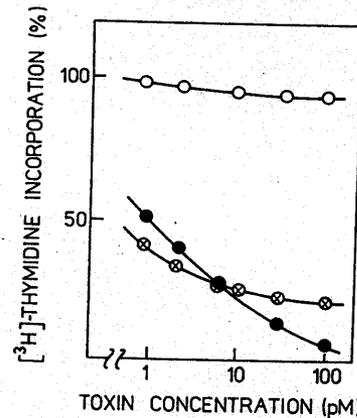
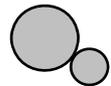
In nanoemulsion



In water



Toxin action on intact β -lymphoma cells ("Namalva" line)

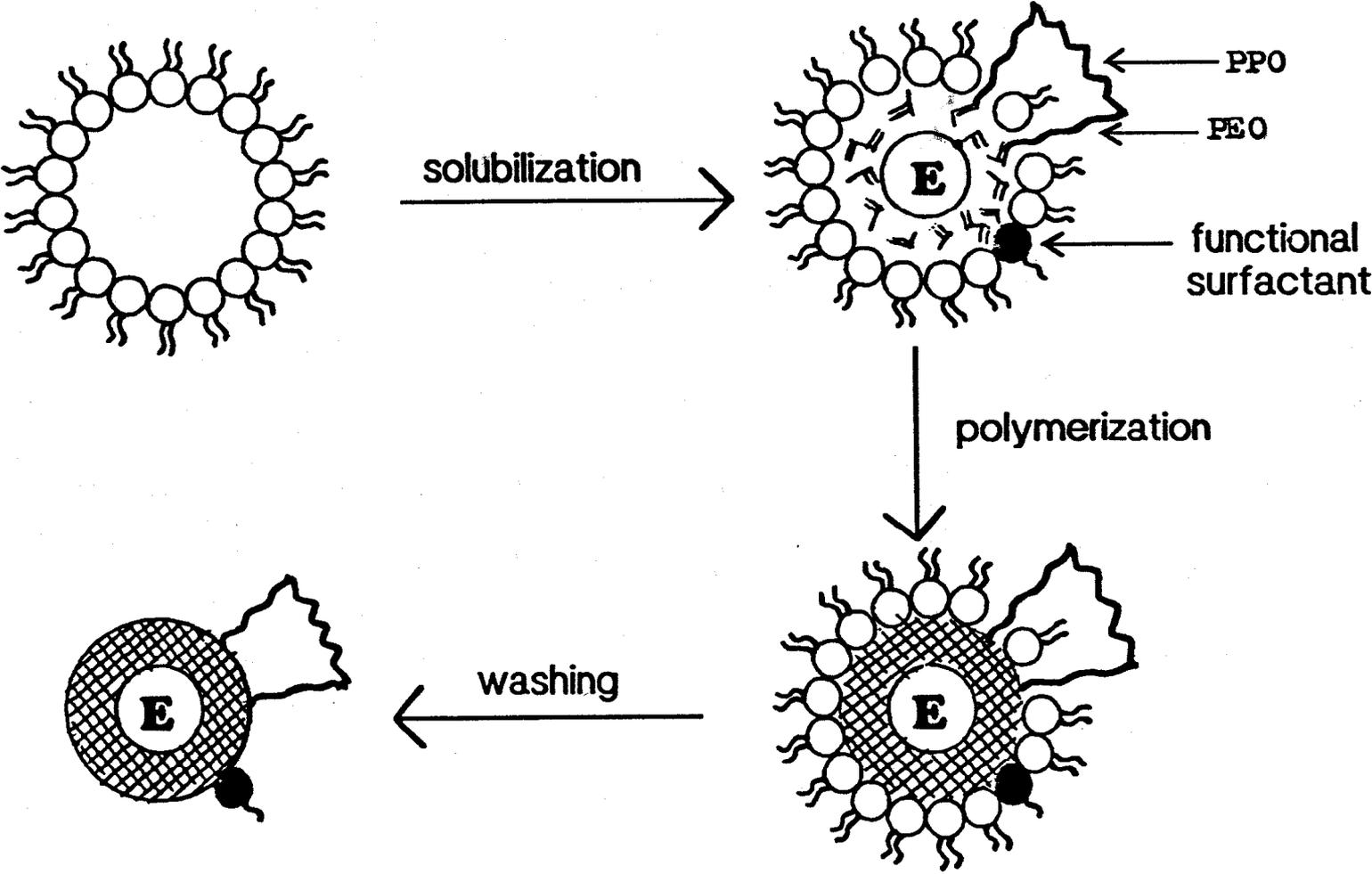


Non-modified ricin A-Chain

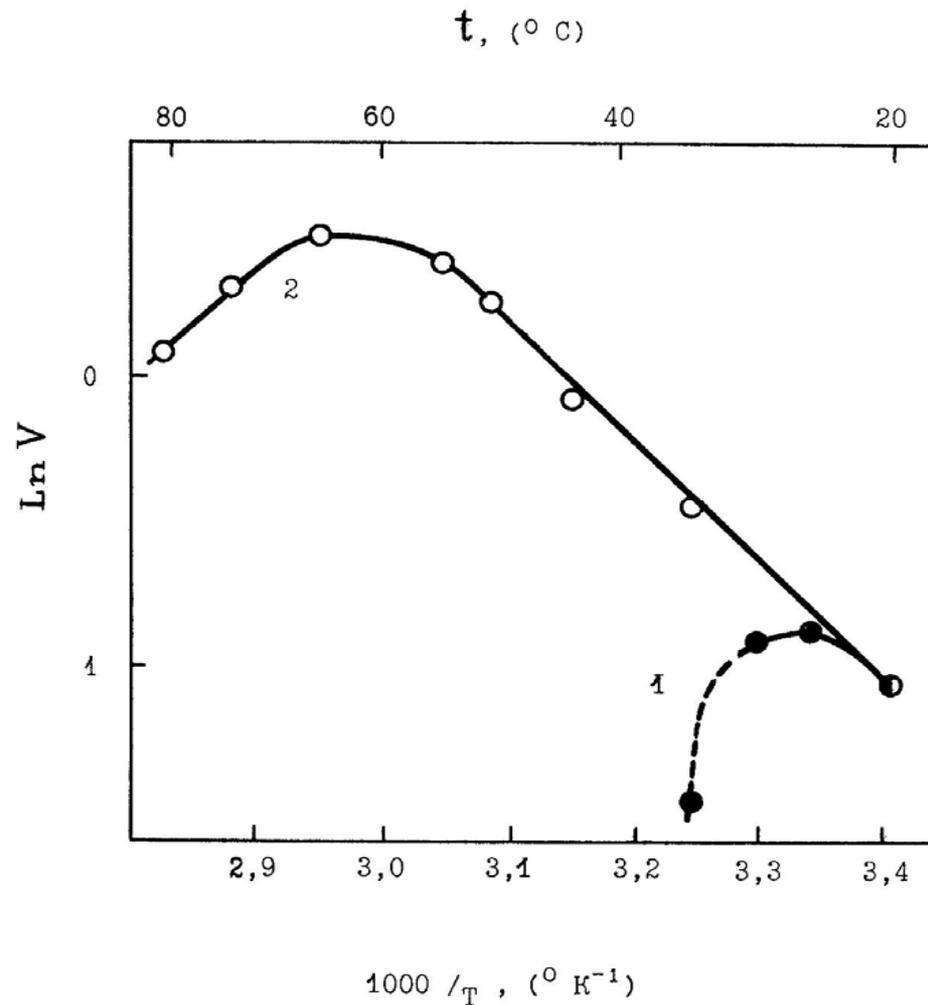
Stearic acid acylated ricin A-Chain

Native AB-chains toxin

PREPARATION OF ENZYME-CONTAINING POLYMERIC NANOPARTICLES



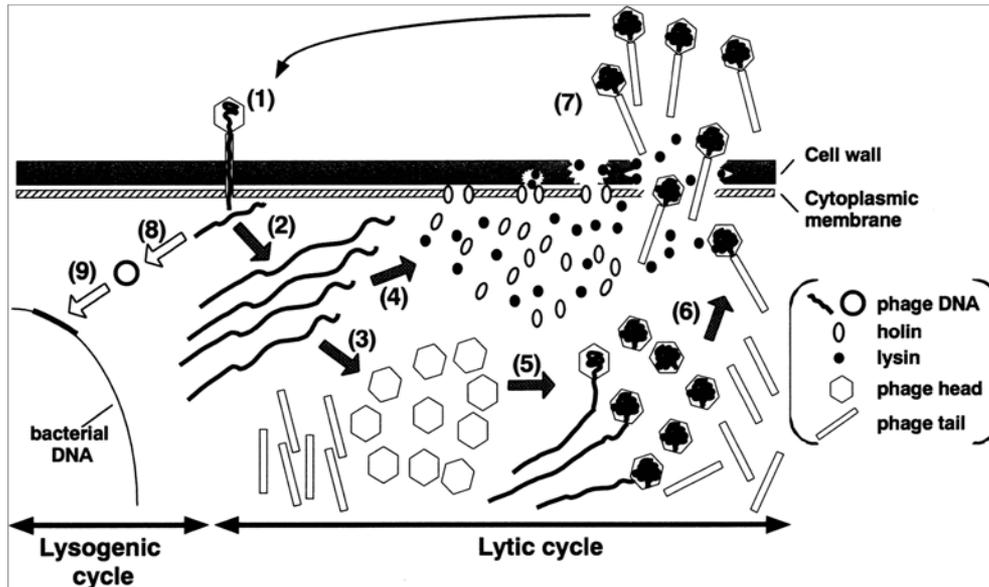
НАНОГРАНУЛИРОВАННЫЙ ФЕРМЕНТ ПРОЯВЛЯЕТ ПОВЫШЕННУЮ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ (2) ПО СРАВНЕНИЮ С ИСХОДНЫМ НЕМОДИФИЦИРОВАННЫМ (1)



Бактериофаги (фаги) – вирусы, способные инфицировать бактерии

Отличаются от вирусов животных и растений

Фаги могут иметь «литический» или «лизогенный» жизненные циклы



Phage-induced bacteriolysis: (1) Adsorption and DNA injection; (2) DNA replication; (3) production of head and tail; (4) Synthesis of holin and lysin; (5) DNA packaging; (6) Completion of phage particle; (7) disruption of the cell wall and release of the progeny; (8) circulation of phage DNA; (9) integration of the phage DNA into the host genome

Преимущества фаговой терапии по сравнению с хемотерапией:

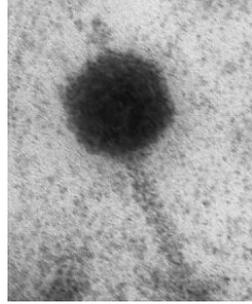
- Эффективны против патогенных бактерий с множественной лекарственной резистентностью;
- Высокая специфичность к целевой бактерии;
- Могут отвечать на появление фаг-резистентных мутантов, т.к. Фаги также способны мутировать;
- Стоимость разработки фаговой системы ниже;
- Не действует на эукариотические клетки, побочные эффекты нетипичны

R.M. Carlton, 1999

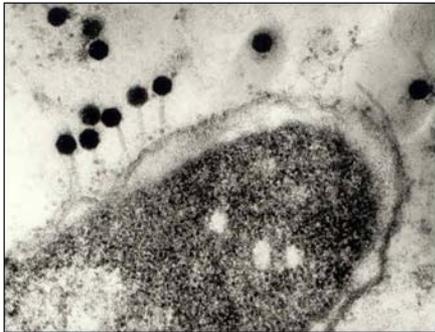
S. Matzuzaki, 2005

К. Мирошников, 2006

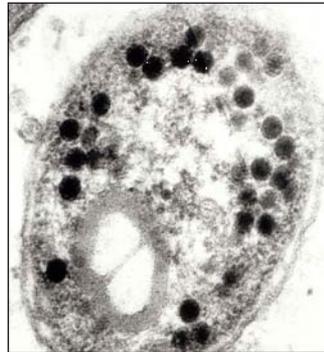
ULTRA-THIN SECTION ELECTRON MICROSCOPY OF PHAGE (CLONE 6) ACTION AGAINST *SALMONELLA TYPHIMURIUM*



20 min

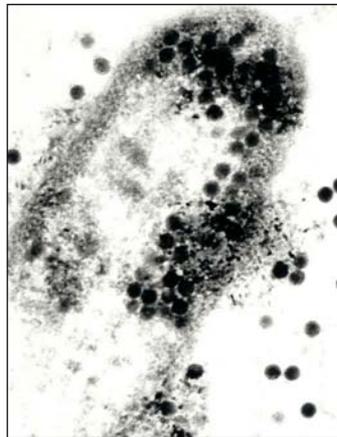


30 min

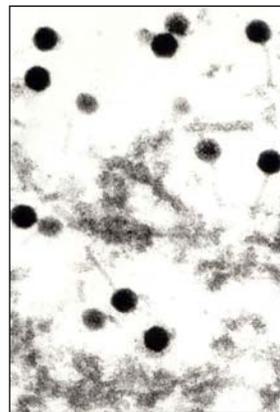


20 and 30 min after infection, *S. typhimurium* cells remain morphologically unchanged (**NO lysis occurs**), but nucleid material is delivered into the cell and phage is multiplied inside

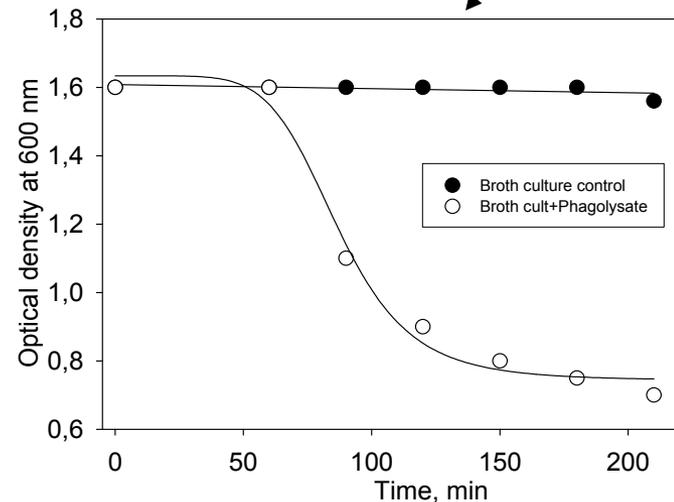
60 and 120 min after infection, **cell lysis is seen** in micrographs and turbidimetric measurements



60 min



120 min

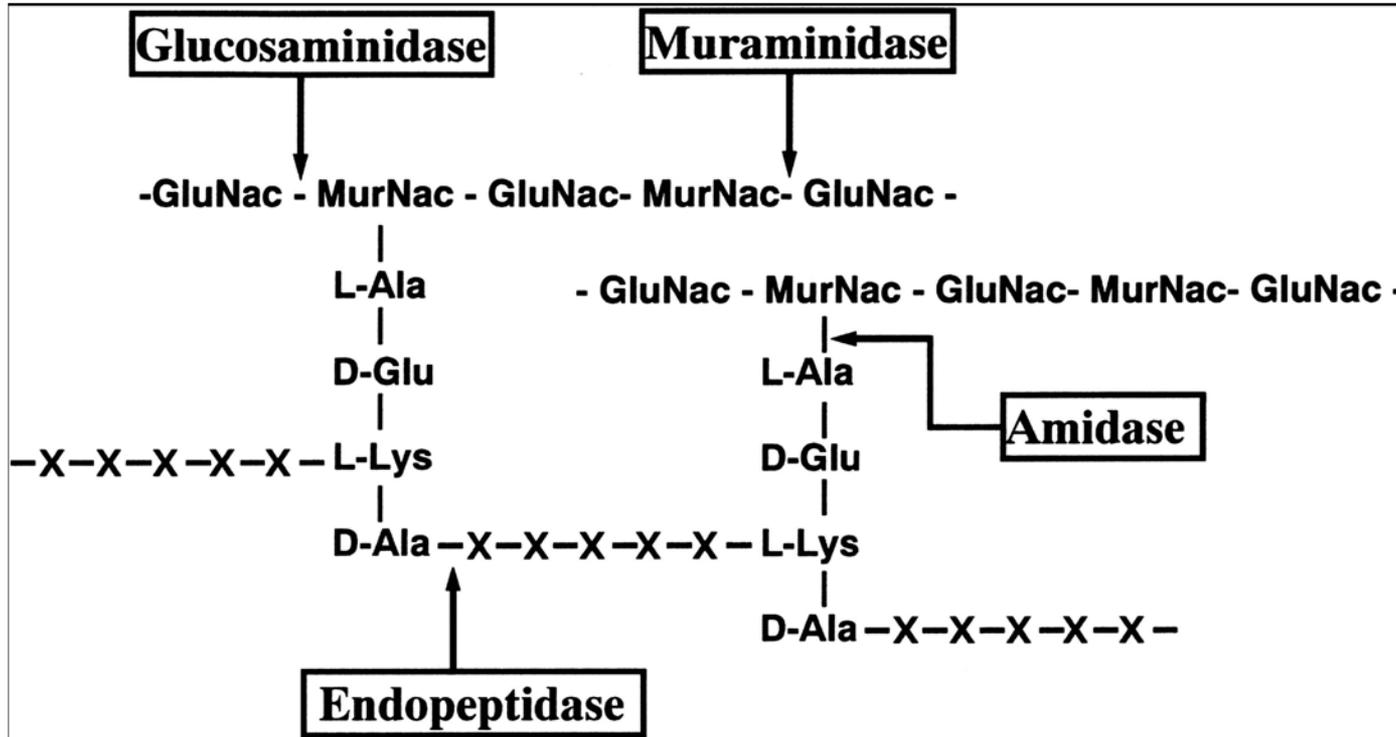


ЛИЗИРУЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИОФАГОВ (ФАГОВЫЕ ЛИЗИНЫ)

Недостатки использования живых фагов:

- Узкий диапазон клеток-хозяев (тщательный скрининг необходим или использование «мультивалентных» фагов);
- Появление бактериальных клеток-мутантов, резистентных к фагам;
- Наличие бактериального дебриса в фаговых препаратах (эндотоксины фатальны);
- Иммунный ответ организма

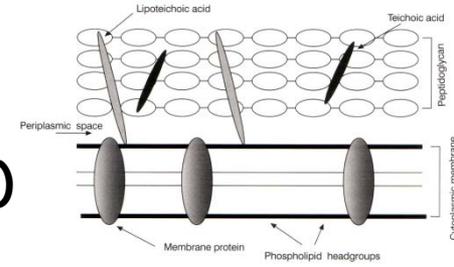
ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИФАГОВ (ЛИЗИНЫ)



Attack points of phage-encoded lysins on the peptidoglycan of gram-positive bacteria;

X shows the amino acid composing the interpeptide bridge of the peptidoglycan. The number and type of amino acids formed differ according to the bacterial species

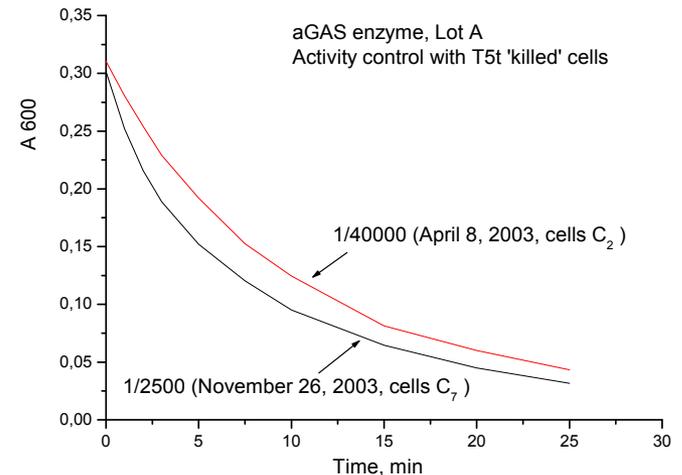
ФАГ-АССОЦИИРОВАННЫЙ ФЕРМЕНТ (PAL, PlyC) ОТВЕЧАЮЩИЙ ЗА ЛИЗИС ГРАМ-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ: *STREPTOCOCCUS PYOGENES*



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

	Lethality
Streptococci	
Group A (human)	++++
Group E (animal)	+++
Group C (human)	+++
<i>S. uberis</i>	+++
Groups B, D, F, G, L, N	0
Oral streptococci	
<i>S. gordonii</i>	+/-
<i>S. oralis</i>	0
<i>S. sanguis</i>	0
<i>S. mutans</i>	0
<i>S. salivarius</i>	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0
<i>Neisseria lactamica</i>	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0
<i>Bacillus pumulis</i>	0
<i>Escherichia coli</i>	0

Литический фермент (PAL, PlyC)
идентифицирован как основной
бактериолитический фактор, продуцируемый
во время инфицирования клеток
бактериофагом C1 (*V.A.Fischetti, 1971*)



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

Недостатки:

Чувствительность к T очень высока
(низкая стабильность):

4°C - месяцы

20°C - часы

37°C - минуты

Цели:

Изучить свойства и выявить факторы, влияющие на лизис стрептококков;

Разработать подходы к стабилизации фермента

PlyC Lysin stability
 expressed as a clearing zone (mm) (upper) and number of colonies counted (bottom).

30 min after preparation (black); after 2 days (light gray); after 2 weeks (gray), and after 2 months (lightest gray);

