

---

# Биокатализ и нанотехнология

---

С.Д.Варфоломеев, Химический  
факультет МГУ





---

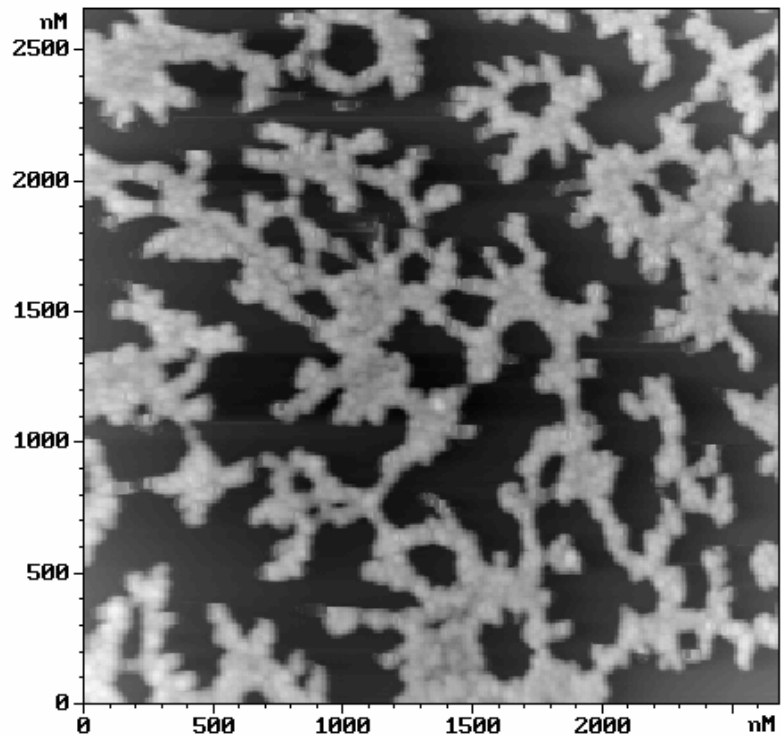
# Ферменты-каталитически функционализированные наночастицы



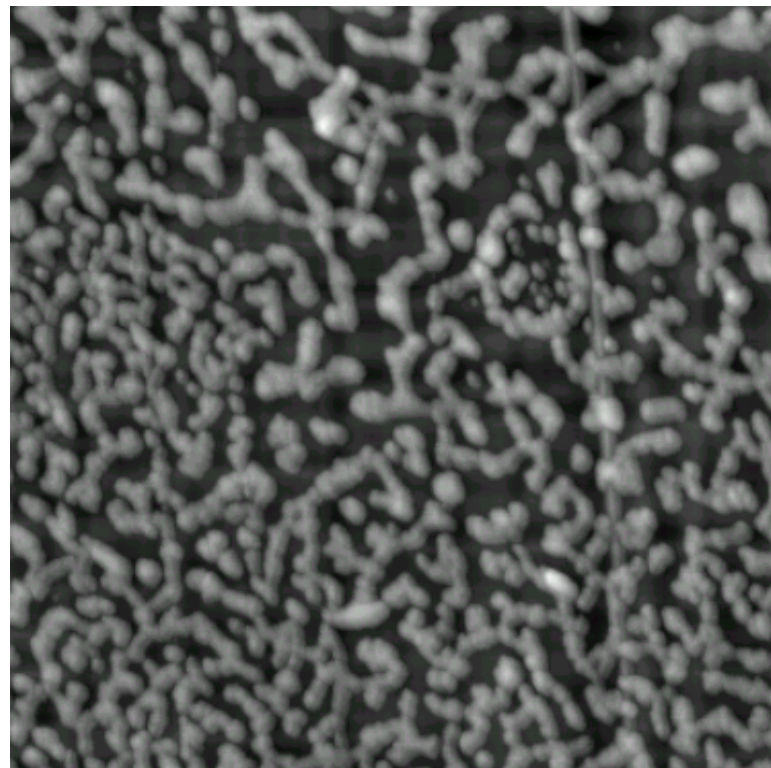


## *Нанотехнология: атомно-силовая микроскопия белков*

### Создание афинных поверхностей



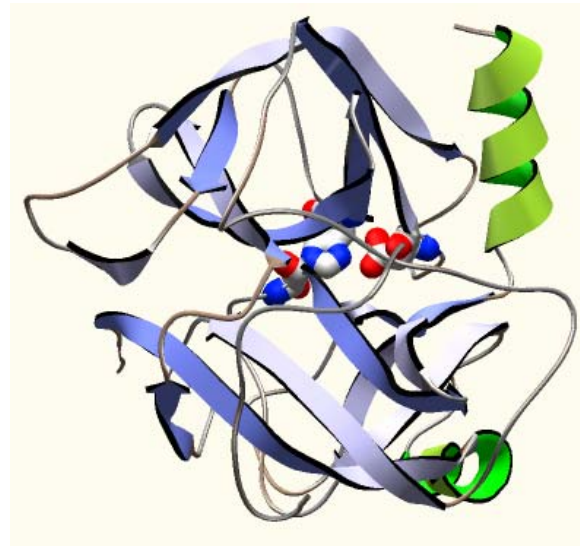
### Визуализация молекул



# Chymotrypsin and Streptogrisin

- Sequences are absolutely different

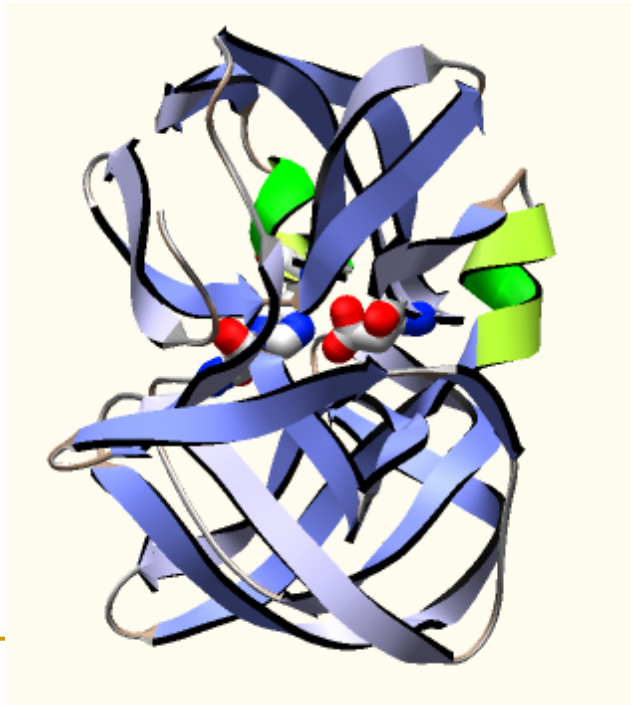
:



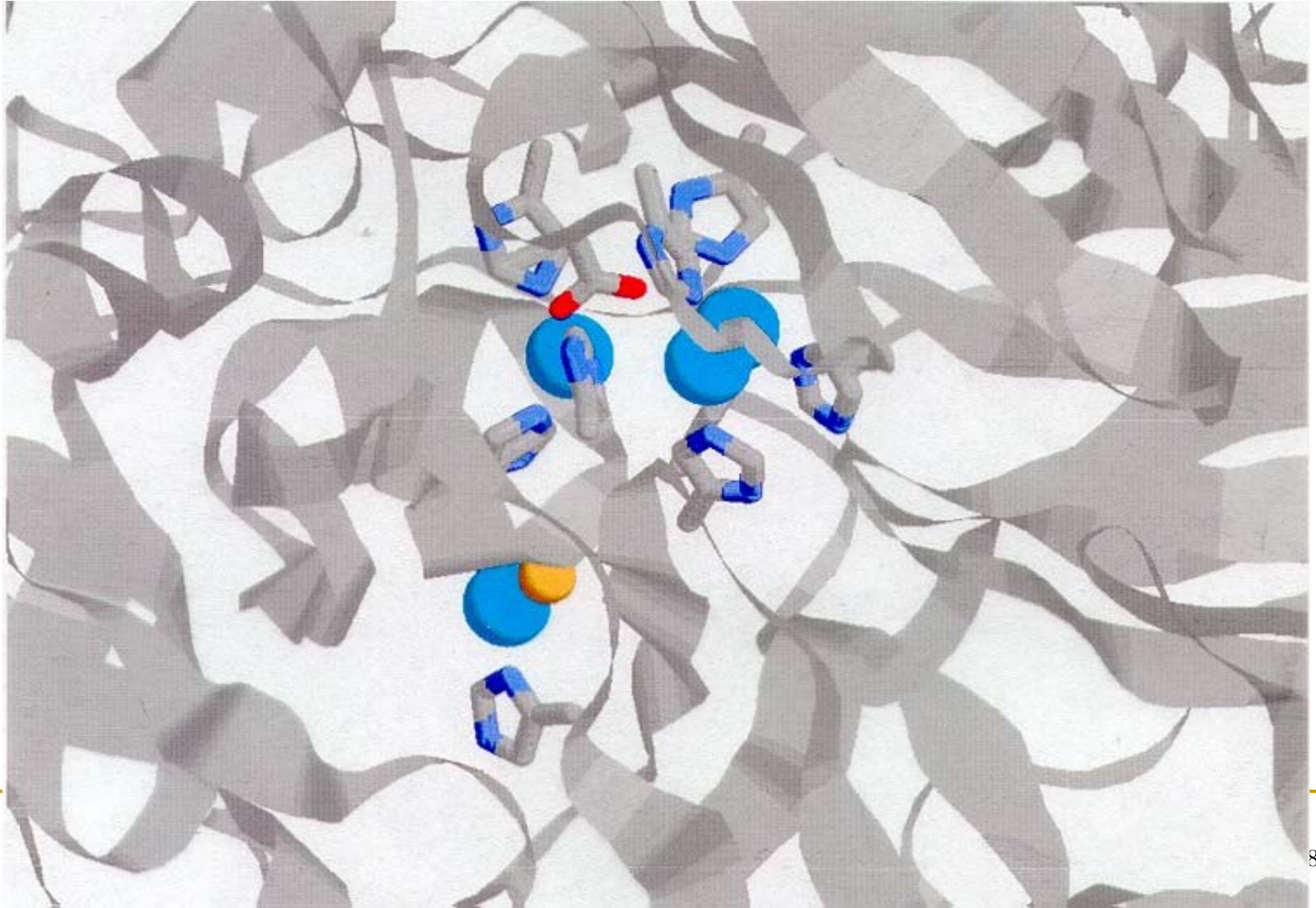
- Catalytical sites are the same

# Streptogrisin and Subtilysin

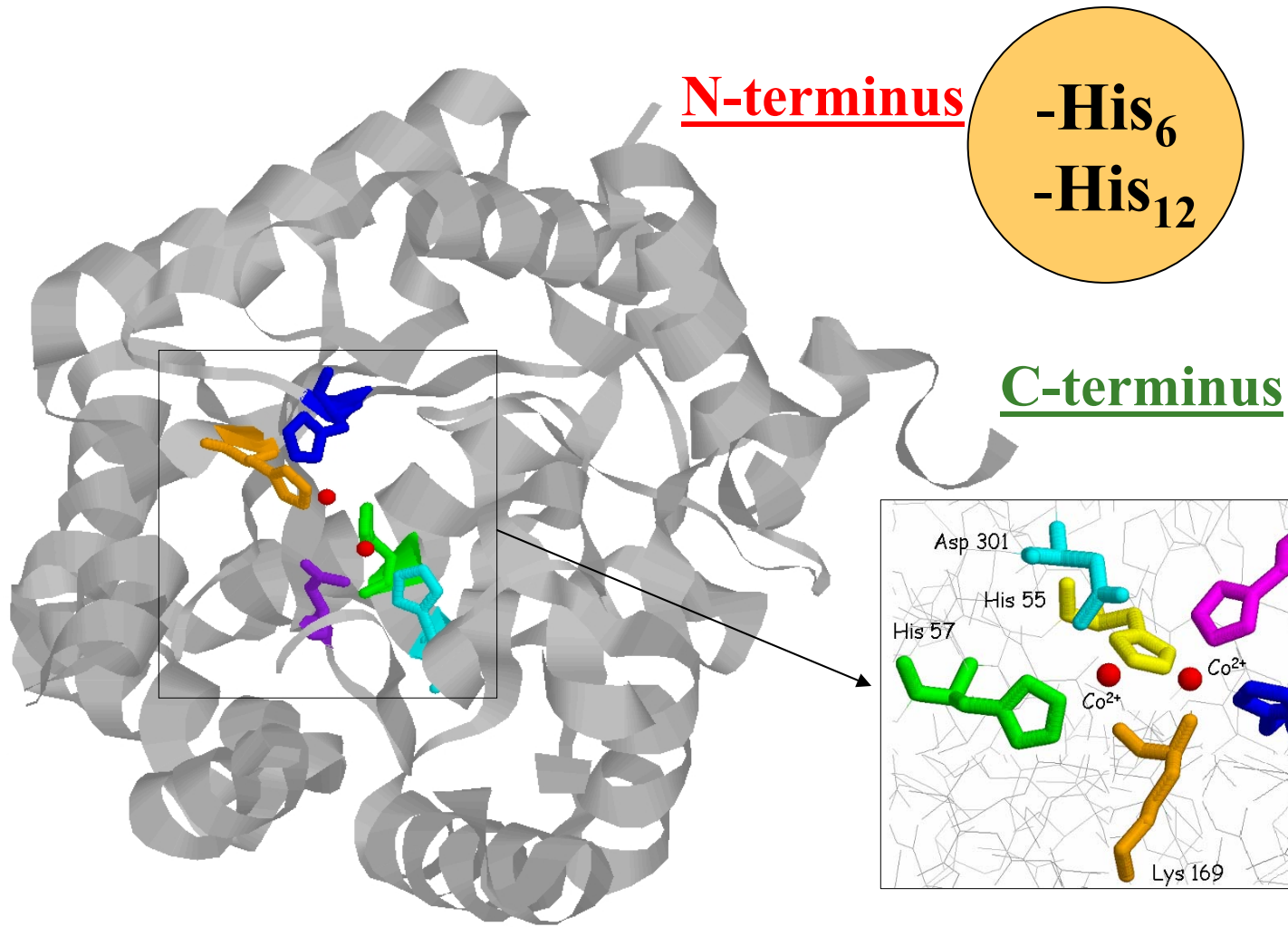
- Secondary structures are absolutely different
- Catalytical sites are the same



## Active site of copper-containing oxidase

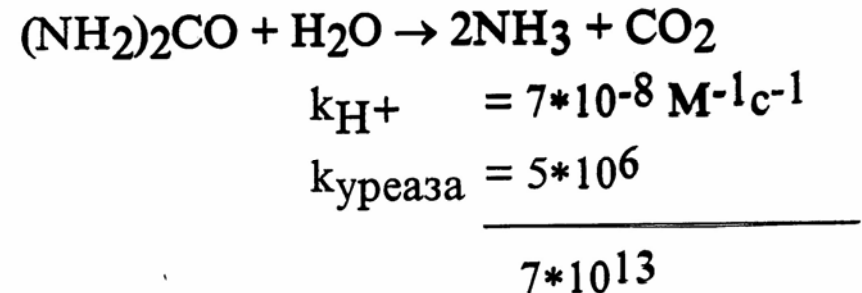




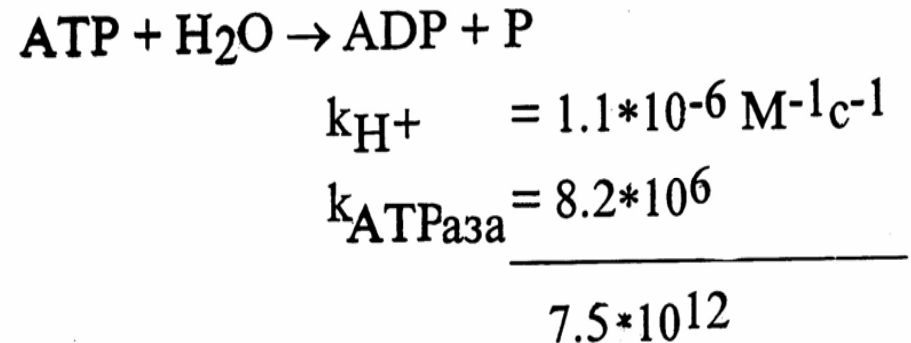


# Ферменты – высокоактивные катализаторы

Гидролиз мочевины



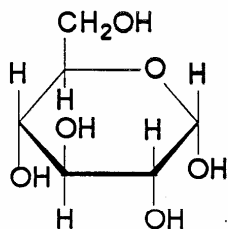
Гидролиз аденозинтрифосфата



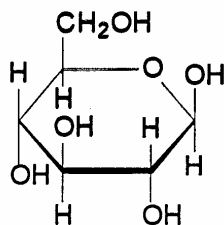
Ферментативная реакция - 1 секунда

Обычная каталитическая реакция – 200000 лет

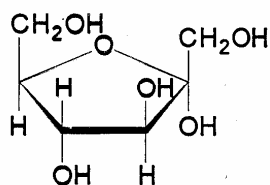
# Ферменты – высокоselectивные катализаторы



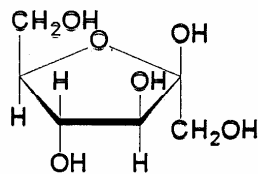
$\alpha$ -D-Глюкопираноза



$\beta$ -D-Глюкопираноза



$\alpha$ -D-Фруктофураноза



$\beta$ -D-Фруктофураноза

## ГЛЮКОЗОКСИДАЗА



Активный центр

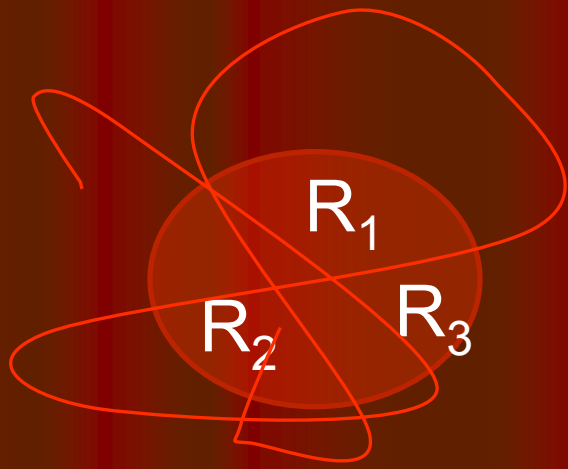
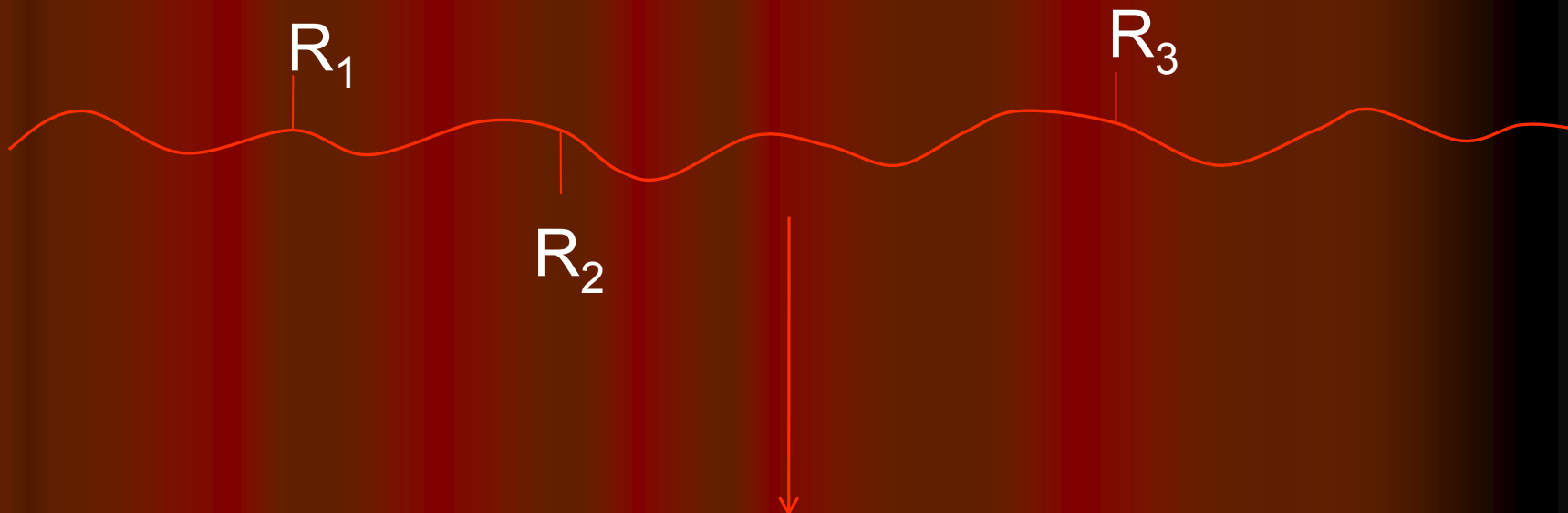
катализатора-продукт

формирования белковой

наночастицы из линейной

полимерной цепи







## Химическая энзимология



### Активный центр фермента

Два  
подцентра

Комплекс  
образующий  
(селектирующий)  
центр

Каталитический  
(активирующий  
молекулы) центр

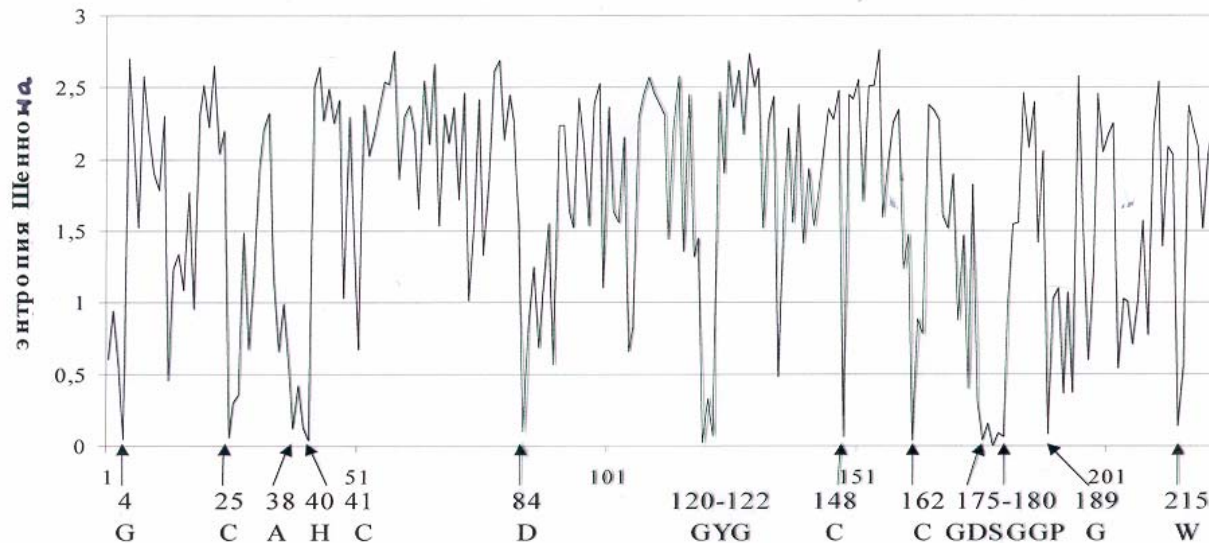


# Идентификация каталитического центра

## Компьютерное сравнение

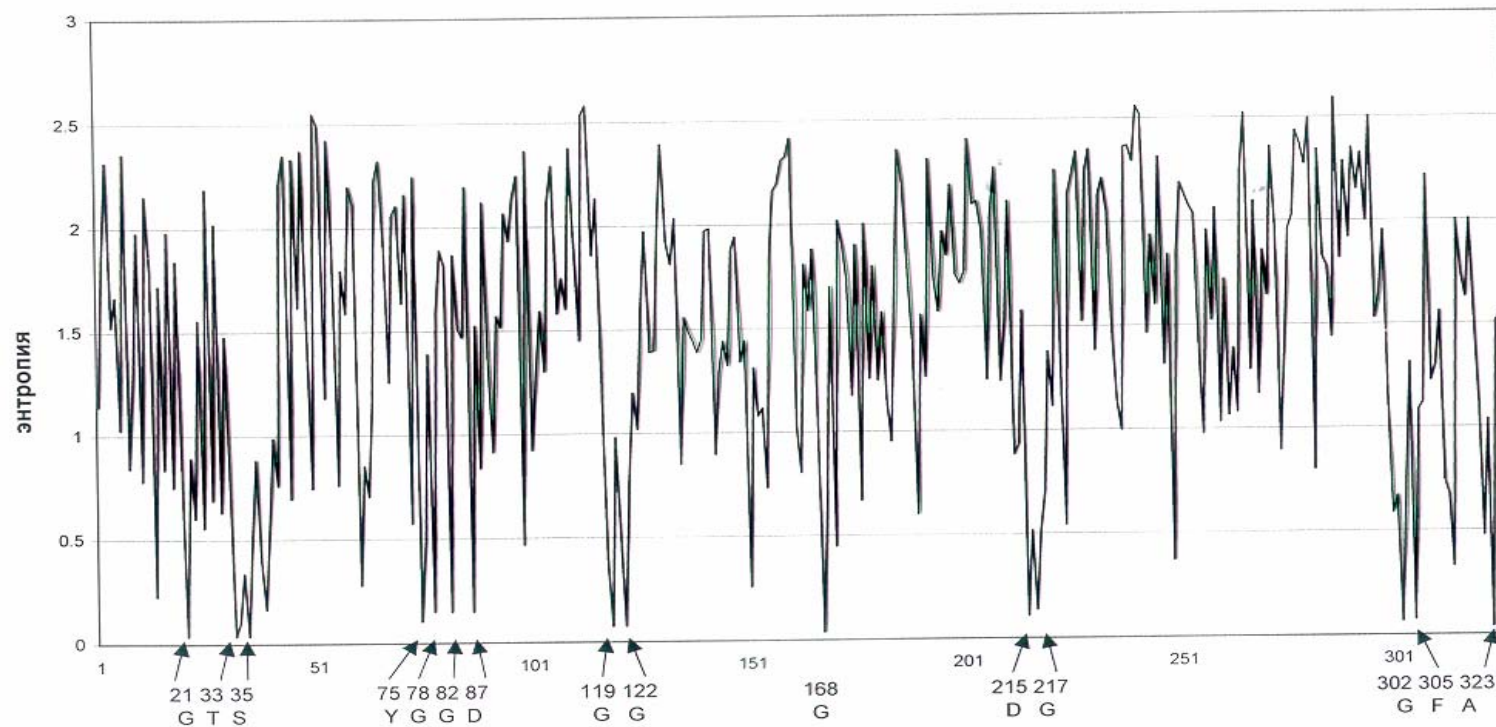
- Первичных последовательностей аминокислот
- Трёхмерных структур

# Информационные технологии в исследовании ферментов

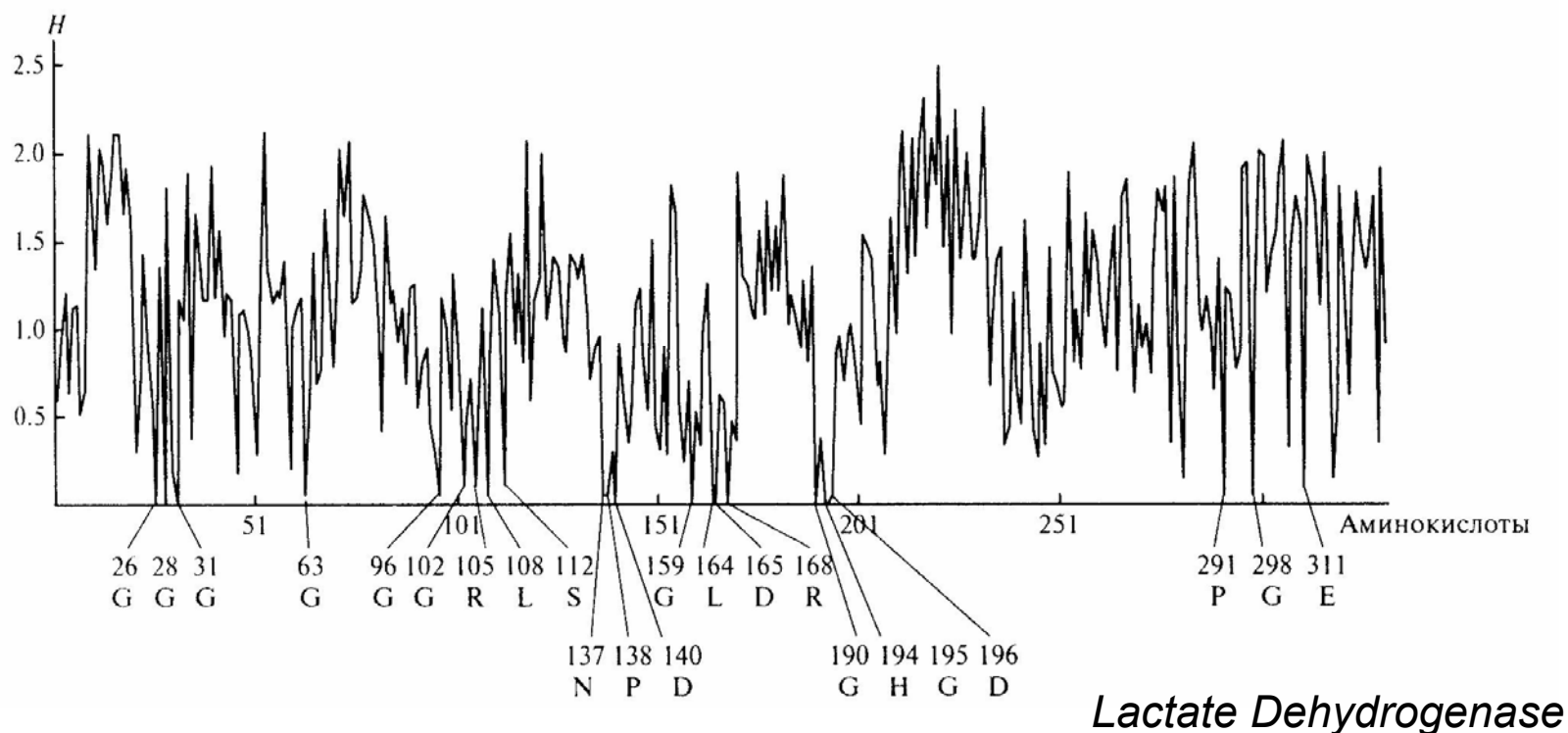


- Идентификация каталитических групп активного центра
- Изучение наиболее существенных аминокислот, формирующих третичную структуру белка
- Идентификация высоковариабельных участков белковой глобулы





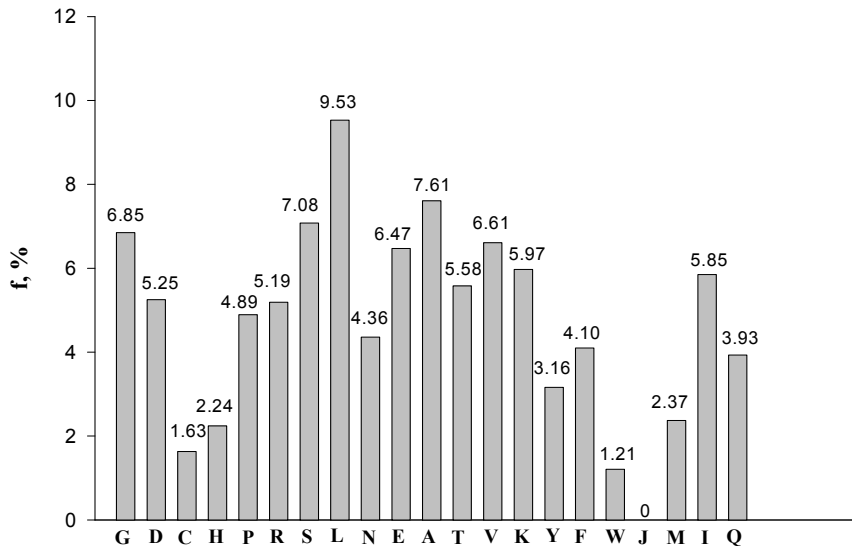
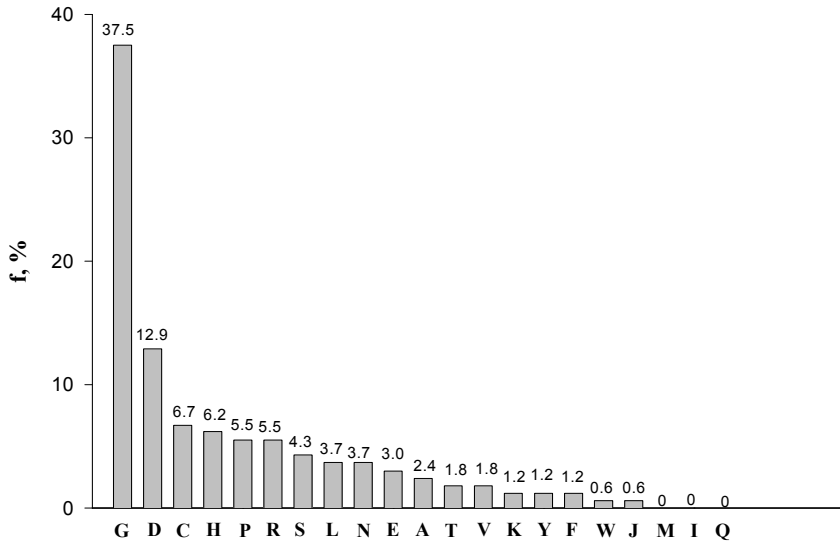
- Большая доля аминокислот в полипептидной цепи родственных ферментов (80-90) высоко вариабельна ( $H > 2$ )
- Существуют несколько позиций являющихся консервативными ( $H \sim 0$ )



- *Аминокислоты, формирующие активный центр фермента, всегда проявляют себя как консервативные*

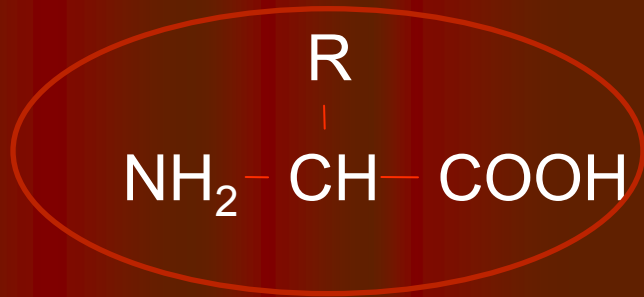
---

*Метод идентификации каталитических групп из данных по последовательности аминокислот в полипептидной цепи*

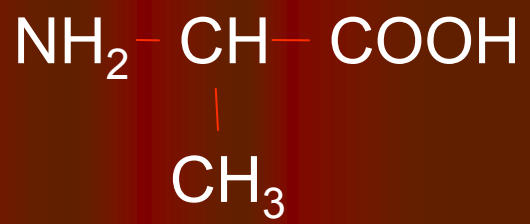


НОКИСЛОТЫ

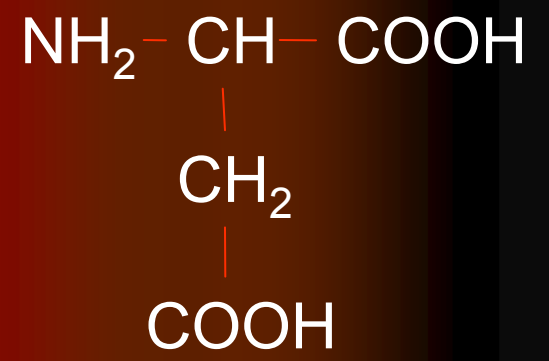
- Рейтинг консервативных аминокислот
- **Глицин-наиболее важная аминокислота в структуре ферментов**
- **Аспарагиновая кислота**
- **Гистидин**
- **Аргинин**



Глицин



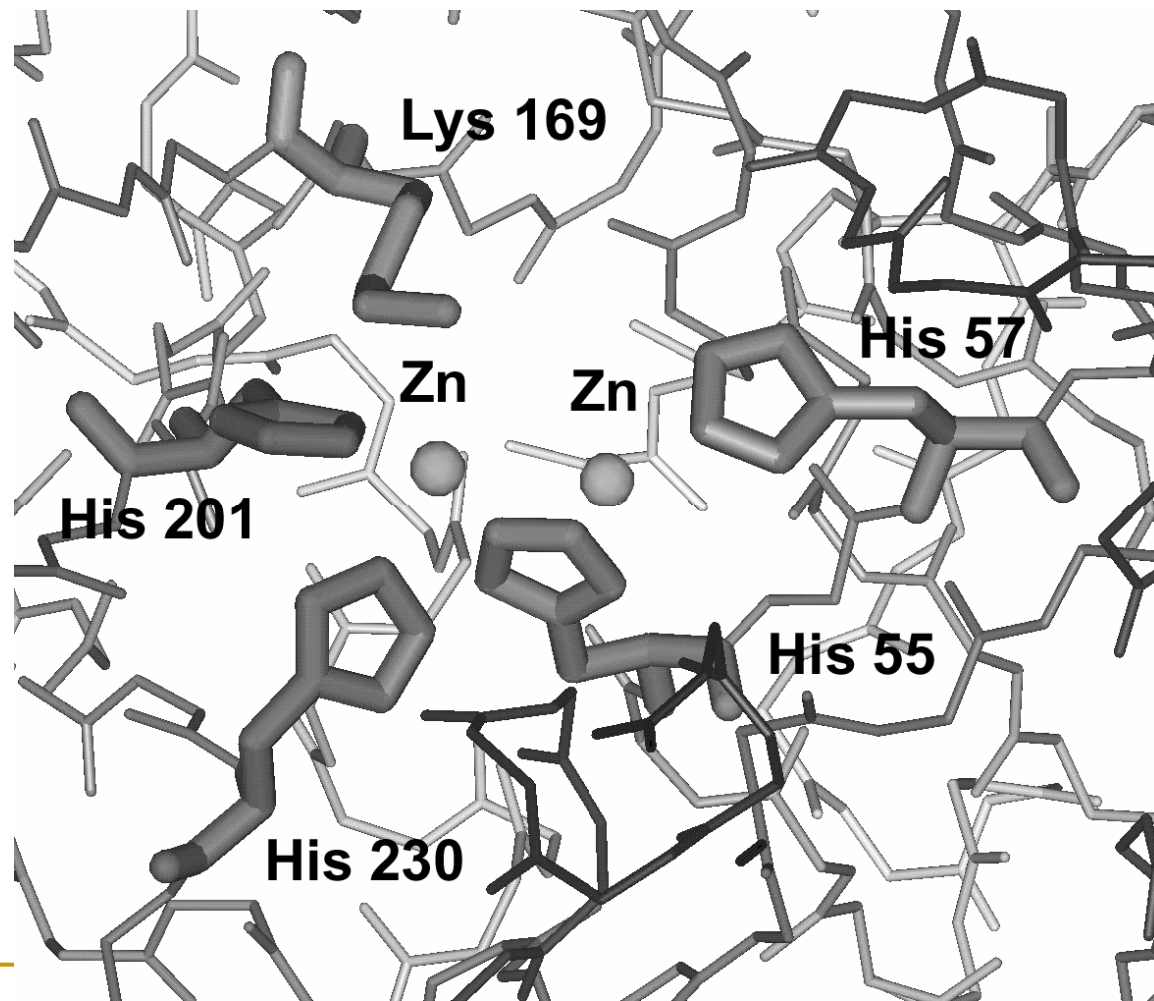
Аланин



Аспарагиновая  
кислота



## 2 Metal ions (2 Zn)\HDB Parathion hydrolase (1DPM)



# Консервативные

глицины-

принципиально важные

точки при

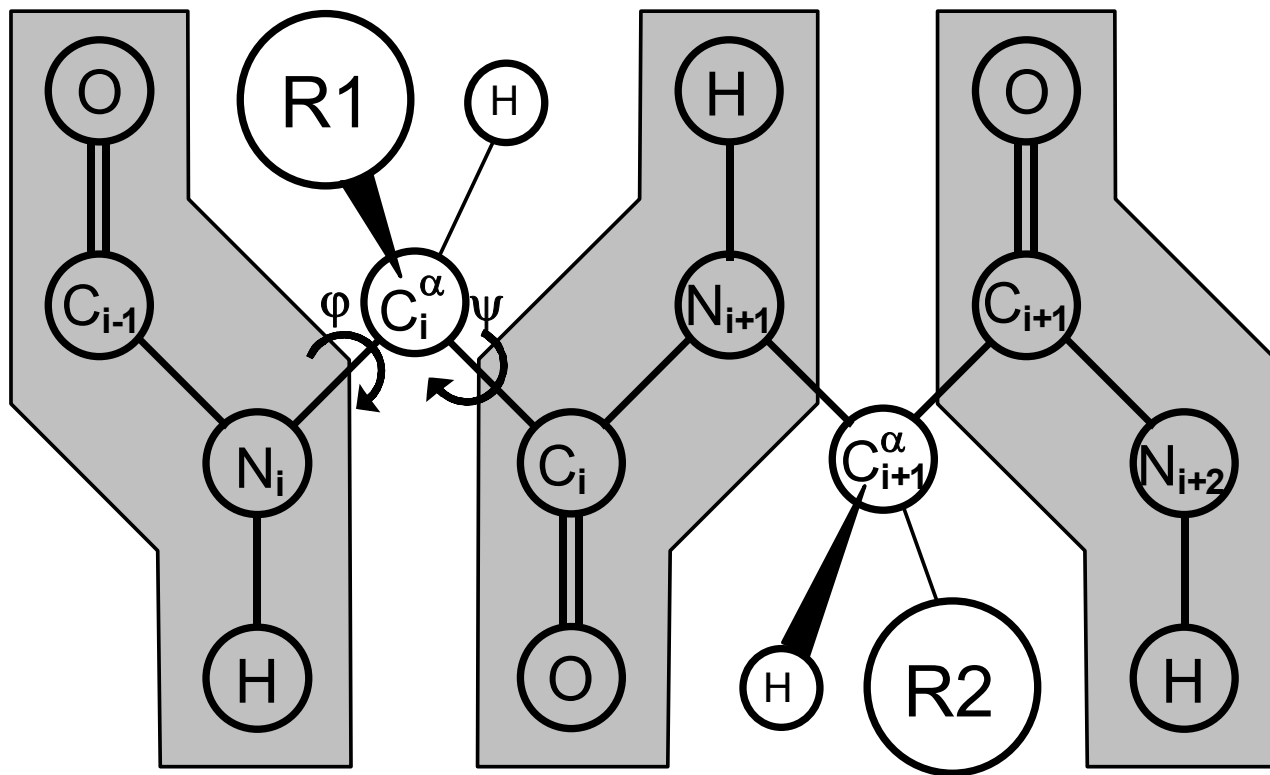
формировании

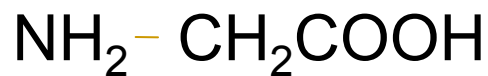
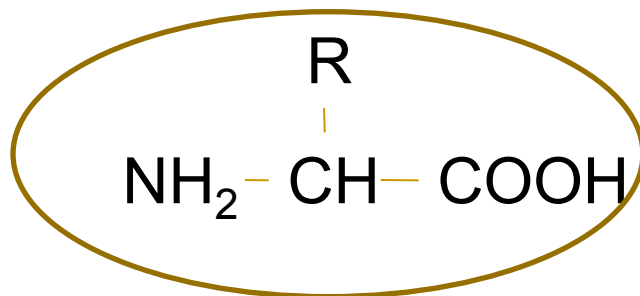
пространственной

структуры белковой

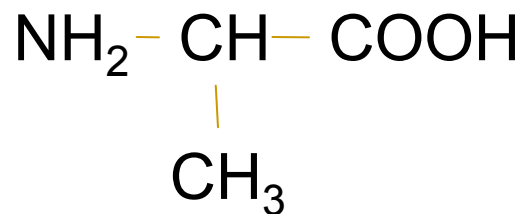
наночастицы и

активного центра

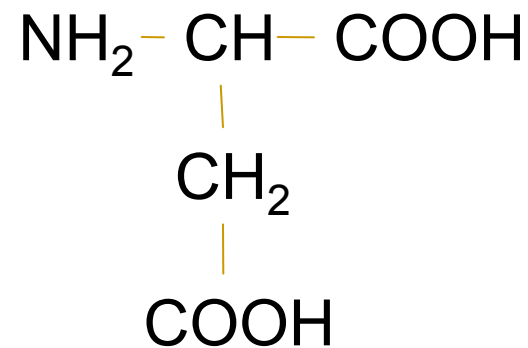




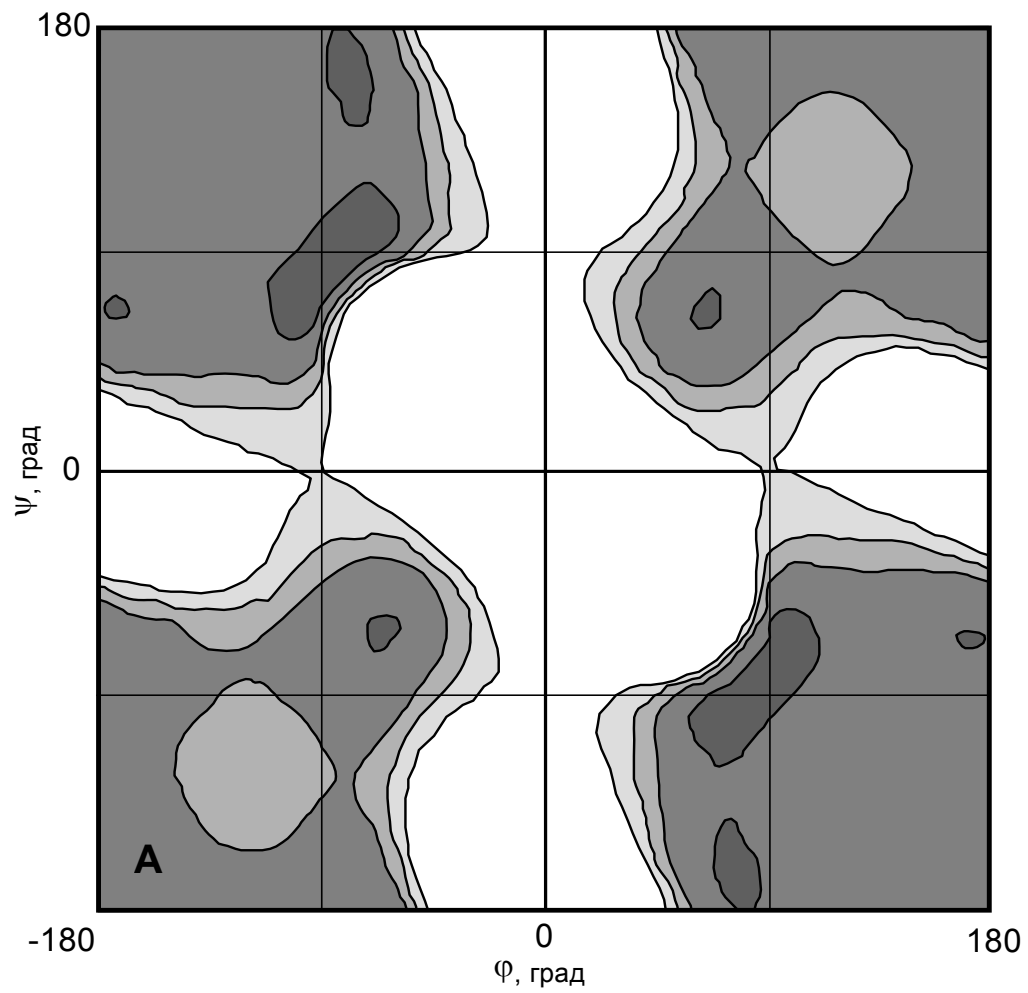
Глицин

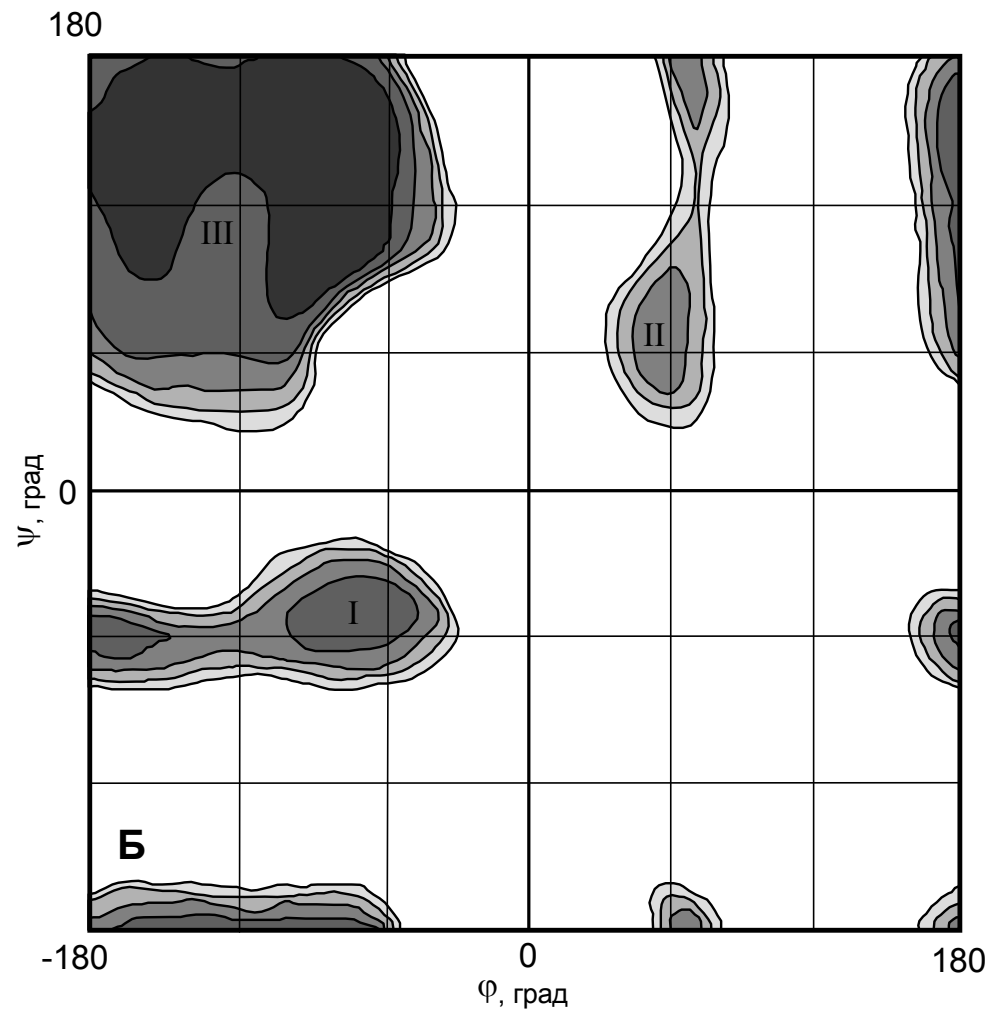


Аланин



Аспарагиновая  
кислота





# Катализ белковыми наночастицами-согласованное взаимодействие кислот и оснований

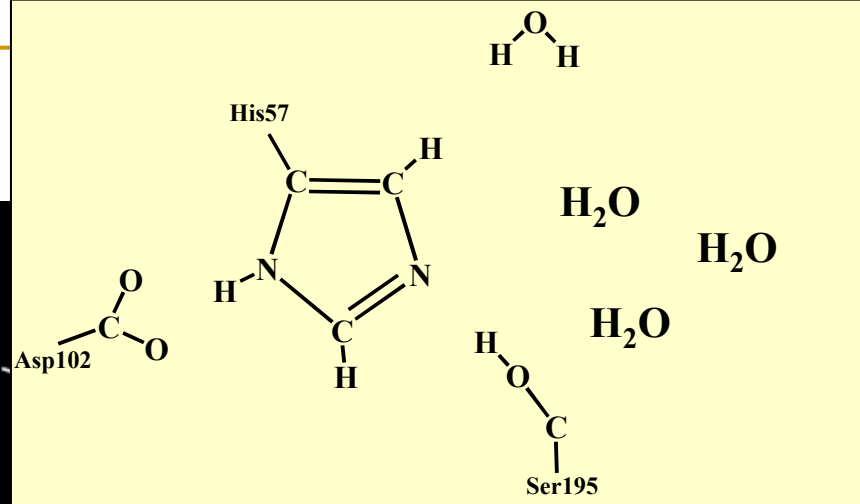
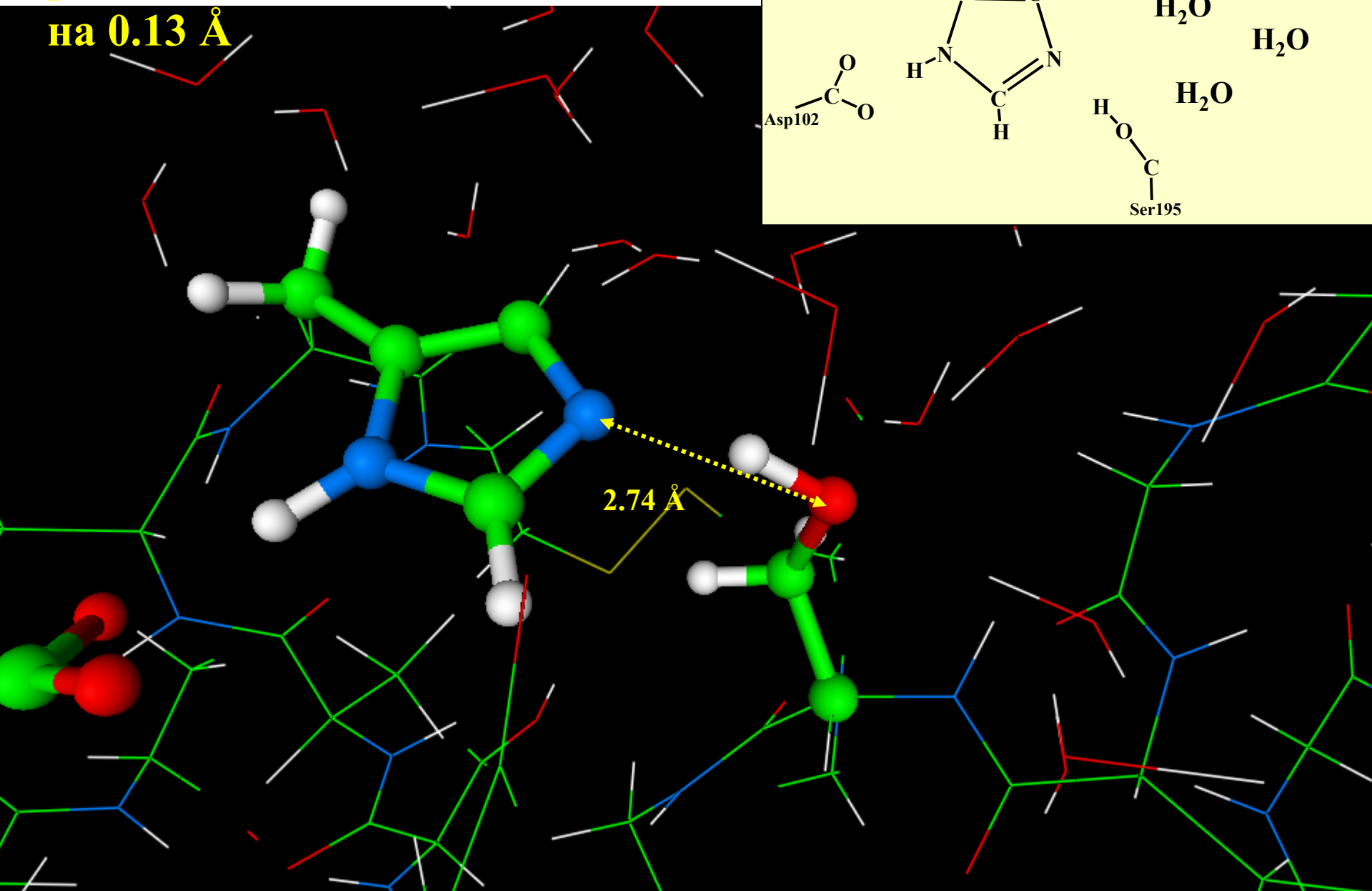


---

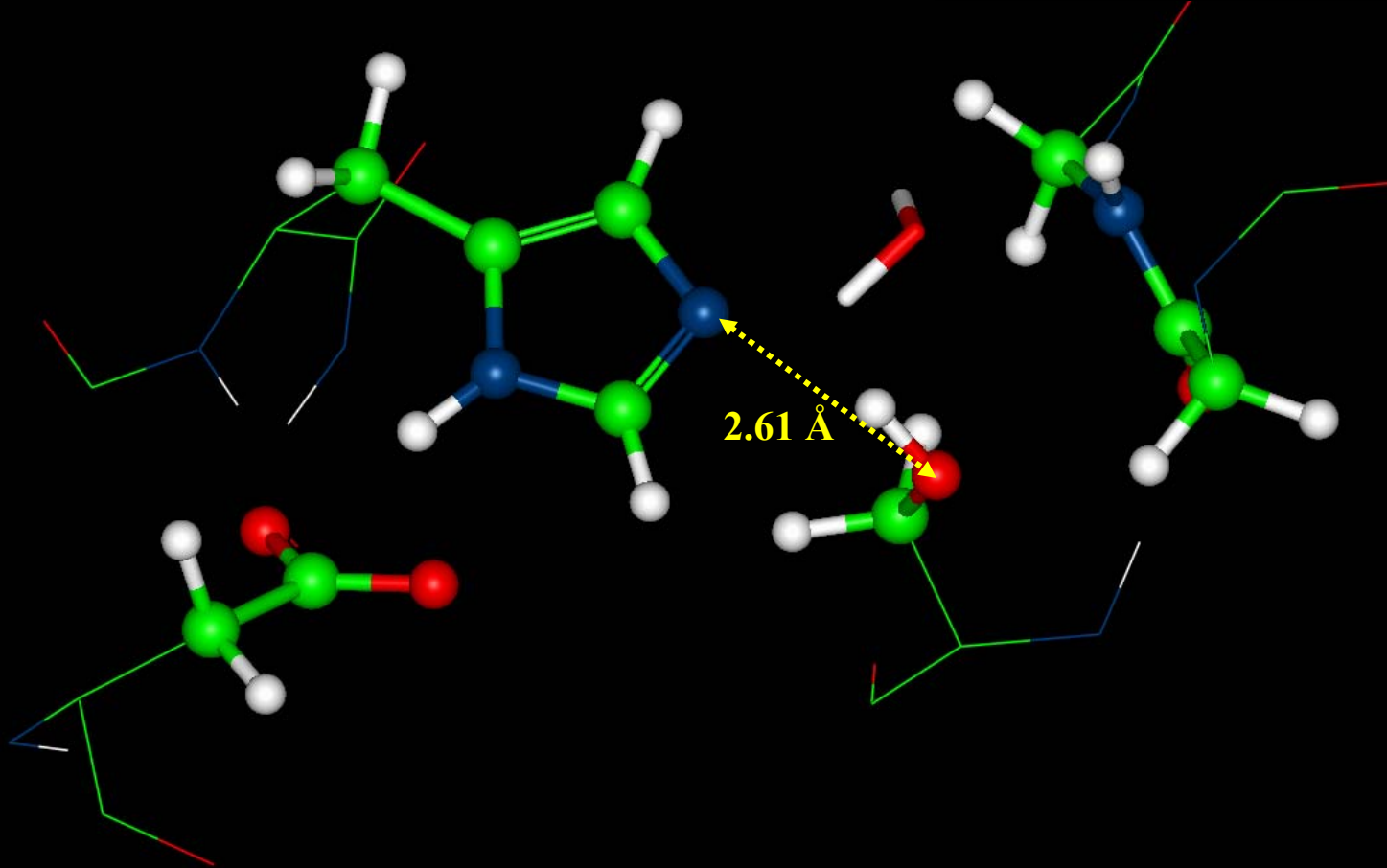
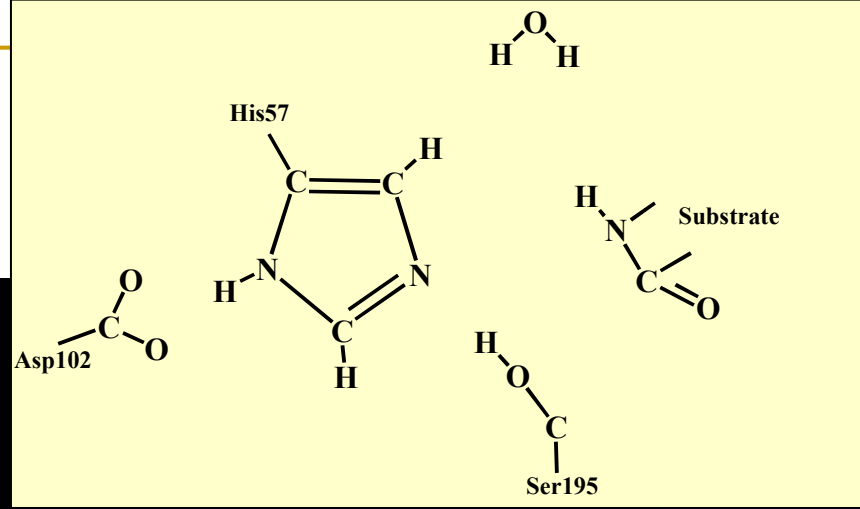
# Квантовая химия в исследовании элементарных актов белкового катализа

- *Идентификация каталитического центра-выделение квантовой подсистемы*
- *КМ/ММ- приближение*

Фермент без субстрата:  
расстояние Ser-His длиннее  
на  $0.13 \text{ \AA}$



# ES комплекс



*Инкремент энергии, необходимой для перемещения протона от Ser к His для восстановления N-H расстояния соответствующему ES комплексу (0,13 А)*

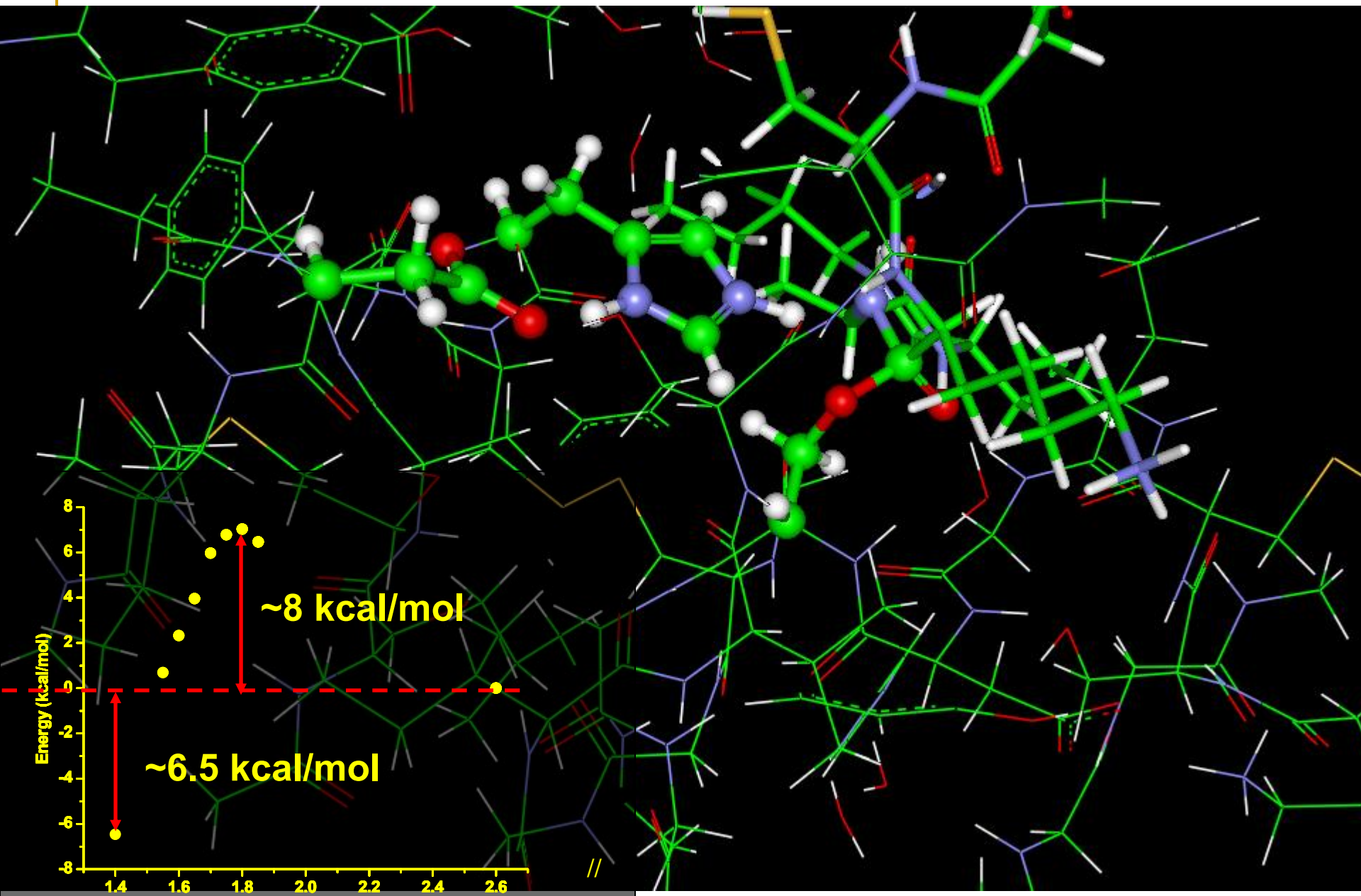


**QM/MM даёт  $\Delta E \approx 3 \text{ kcal/mol}$**

**В соответствии с теорией переходного состояния**

$$k = 6 \cdot 10^{12} \exp(-\Delta E^\ddagger / RT),$$

$$k_1/k_2=150$$



R(C-O), Å

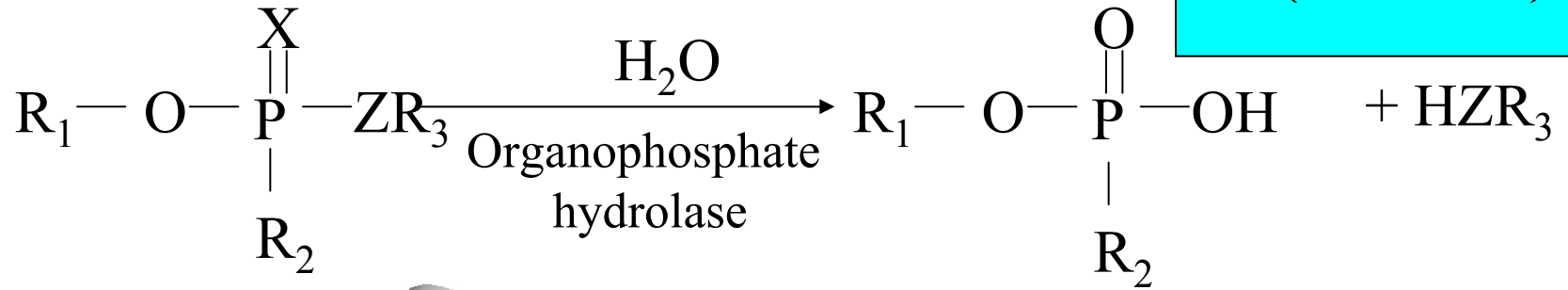
---

# Химическая и генетическая модификация ферментов- придание новых свойств

---

*Principal scheme of hydrolytic reaction catalyzed by organophosphate hydrolase (EC 3.1.8.1)*

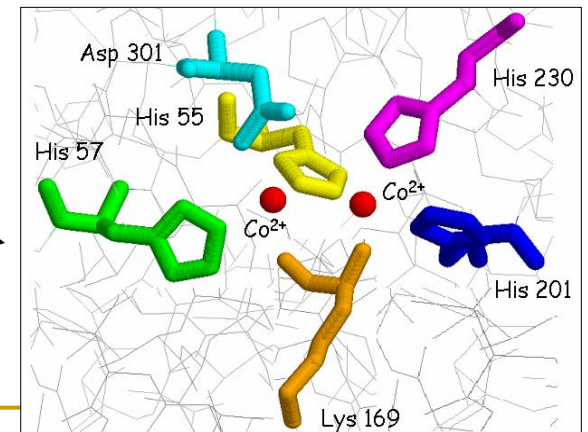
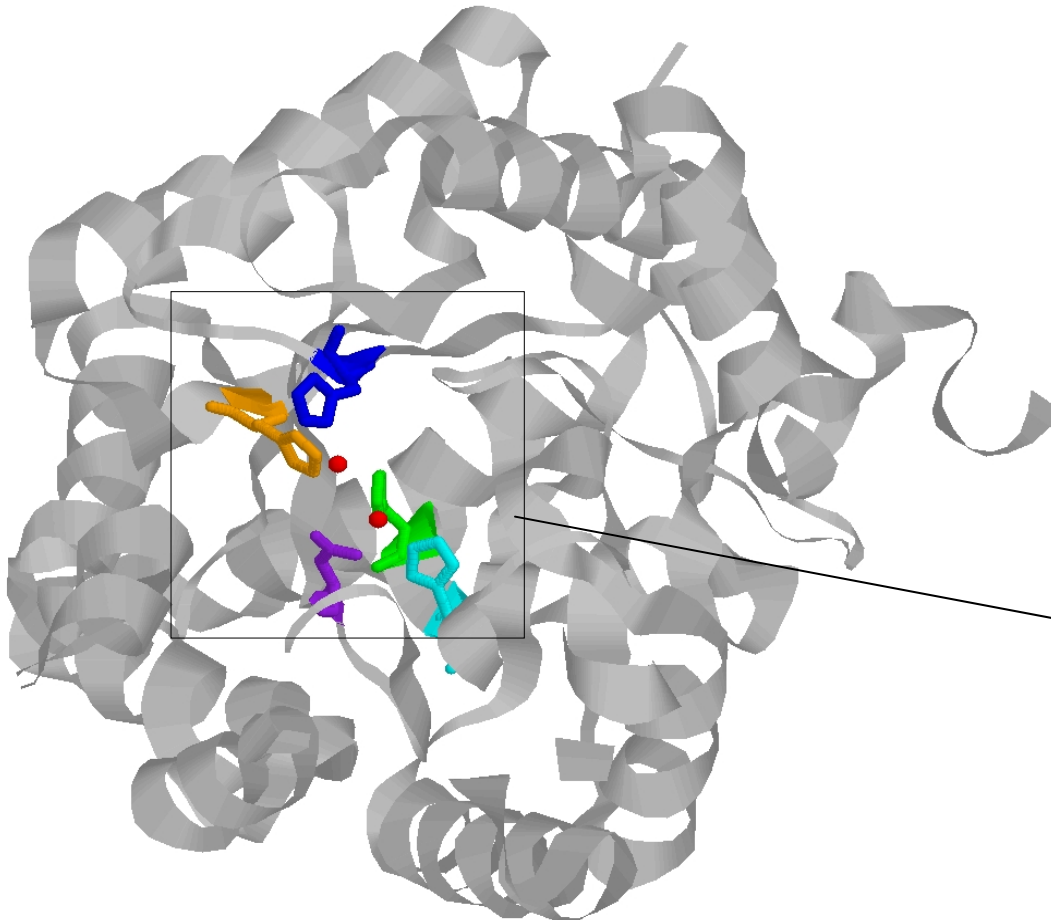
**Organophosphate hydrolase (EC 3.1.8.1)**



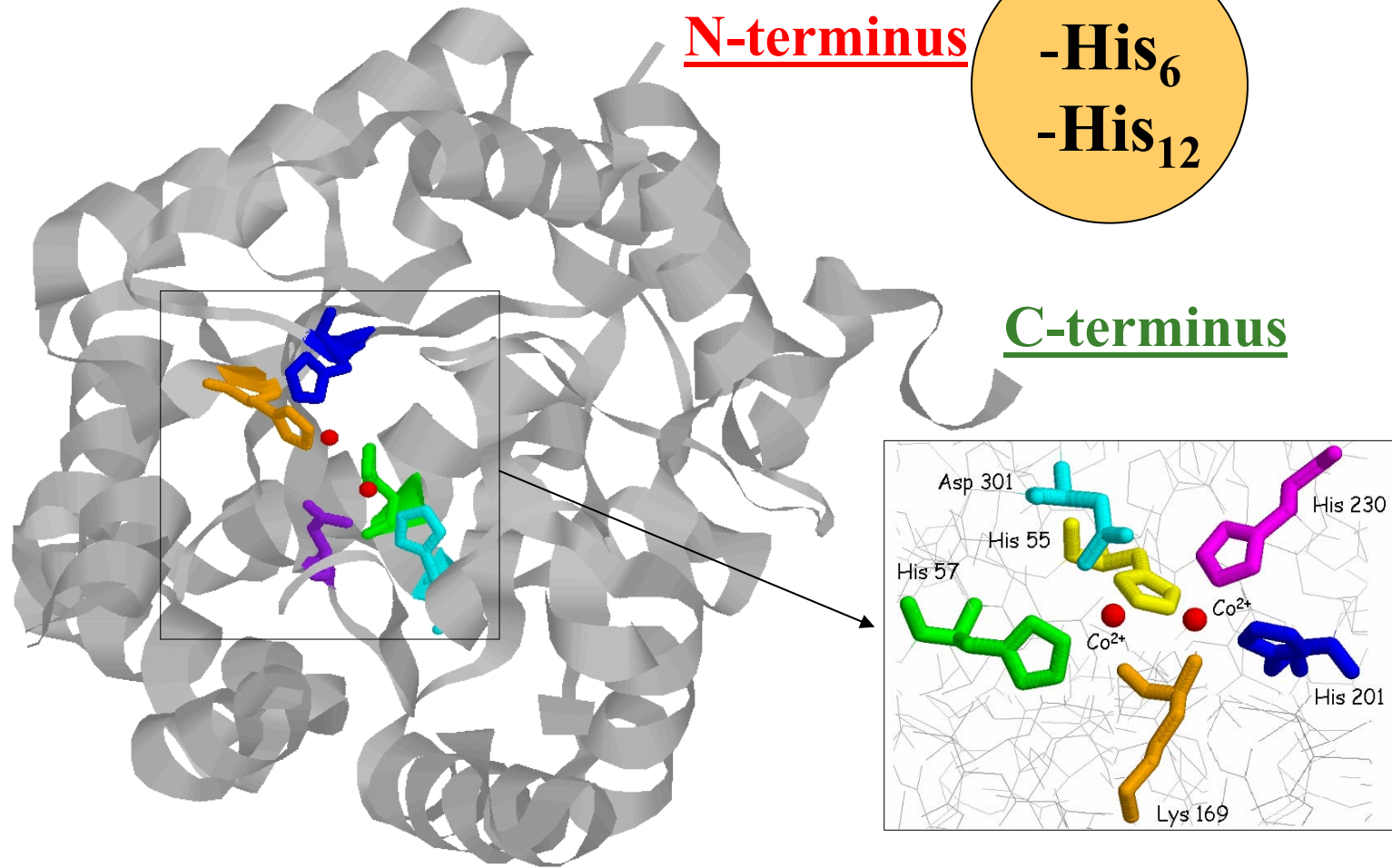
X = O, S

Z = O, S and F,

when R<sub>3</sub> is absent

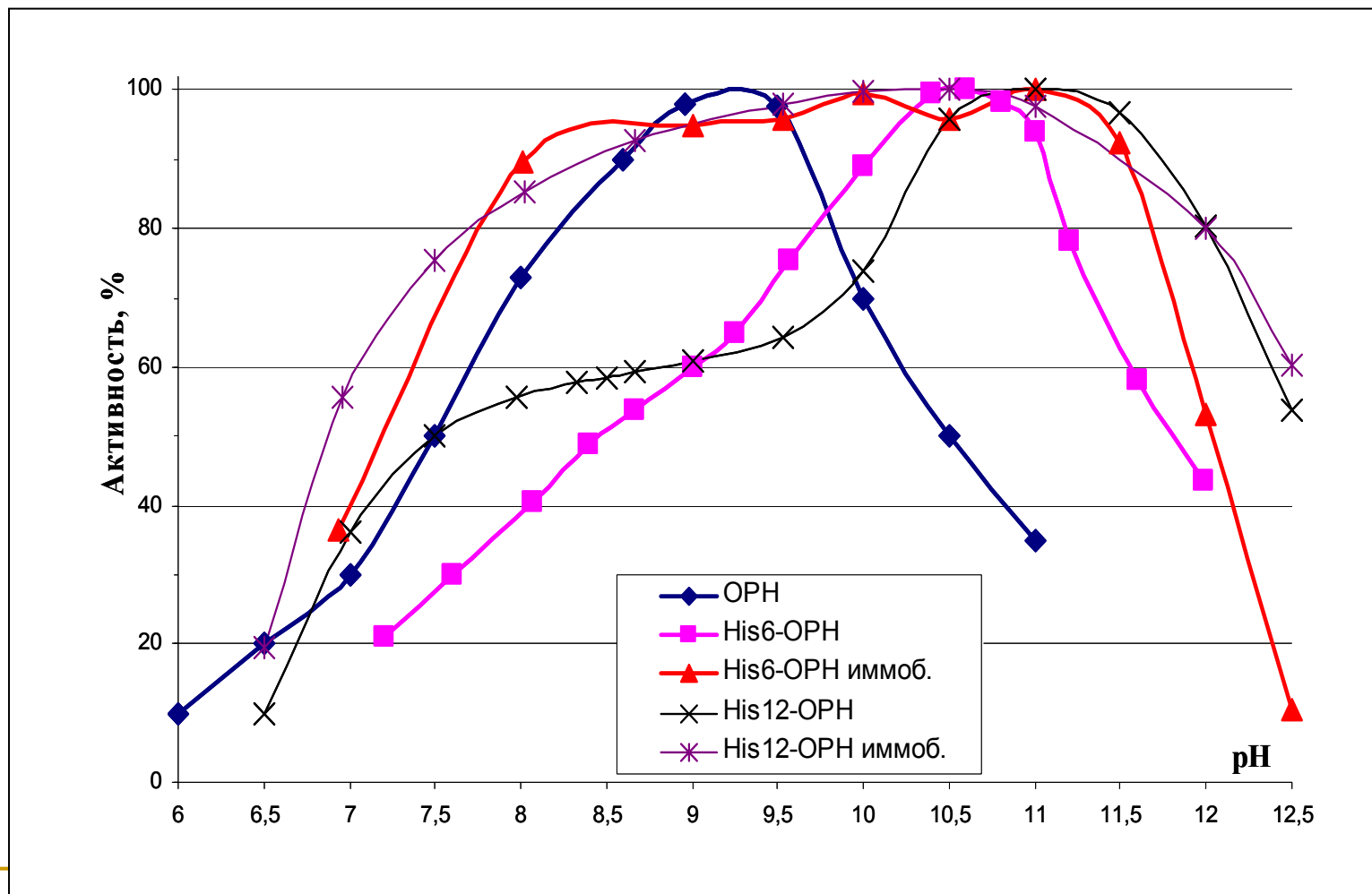






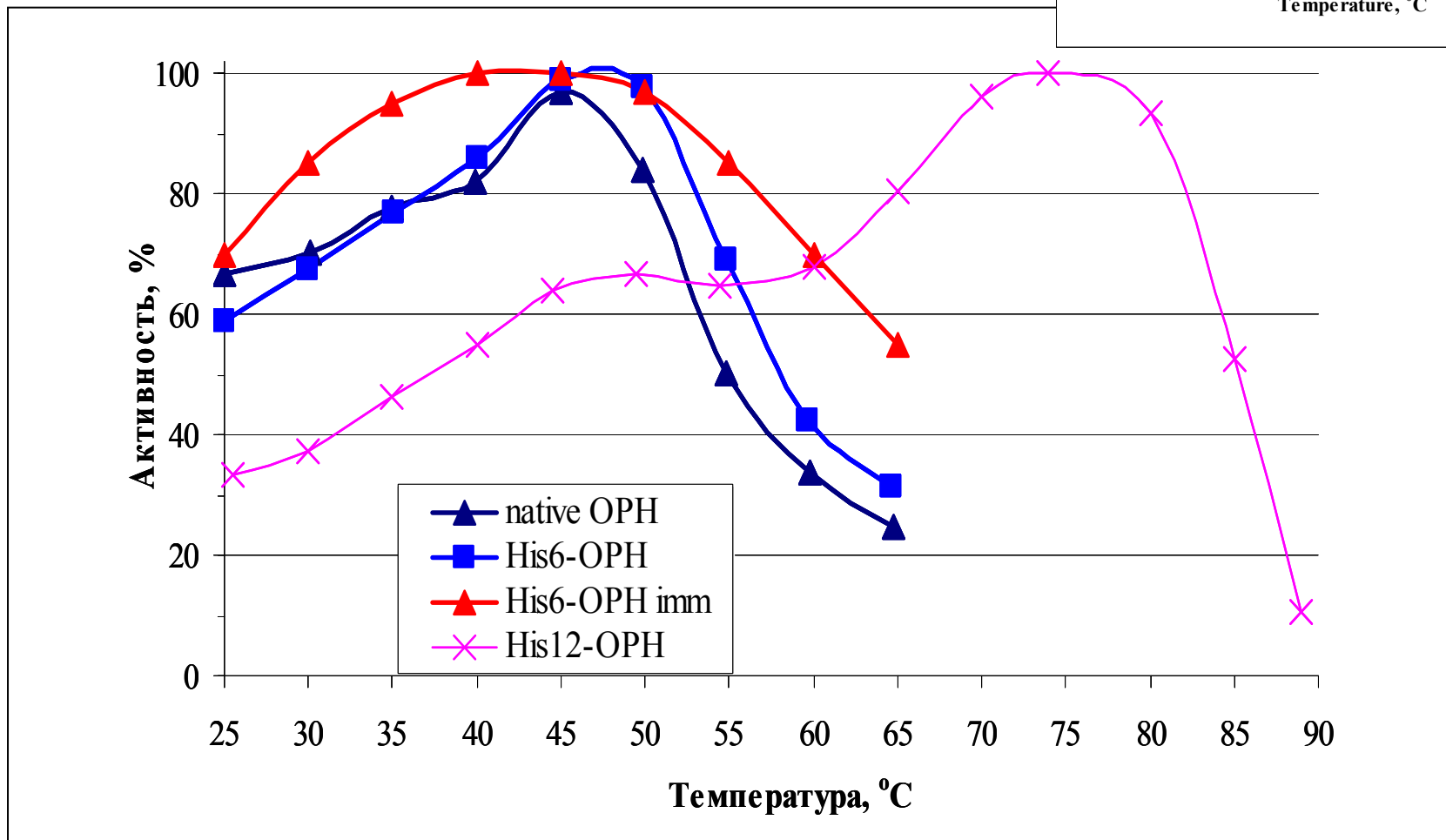
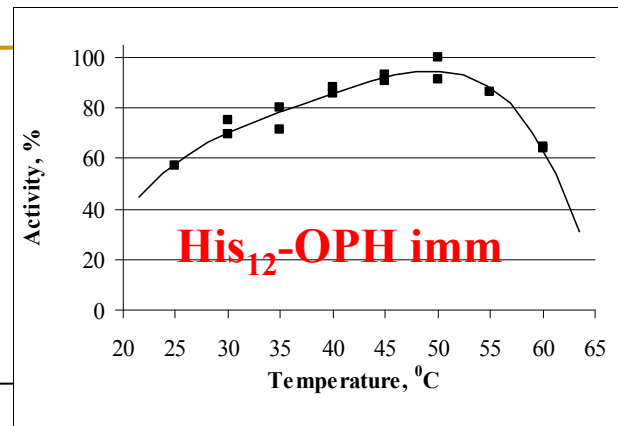
- Presence of affine tags in the protein structure
- Systems for highly efficient expression of proteins (plasmids and strains)
- Optimized conditions for high yield of enzyme synthesis in the soluble active form

# pH-optimum of native and polyhistidine-containing OPH in the soluble and immobilized forms (Cu-IDA-cryoPAAG)



Conditions: 25°C, 2 mM Paraoxon, 50 mM buffers

# Temperature optimum of native and polyhistidine-containing OPH in the soluble and immobilized forms (Cu-IDA-cryoPAAG)



Conditions: pH 10.5; 2 mM Paraoxon, 50 mM buffers

---

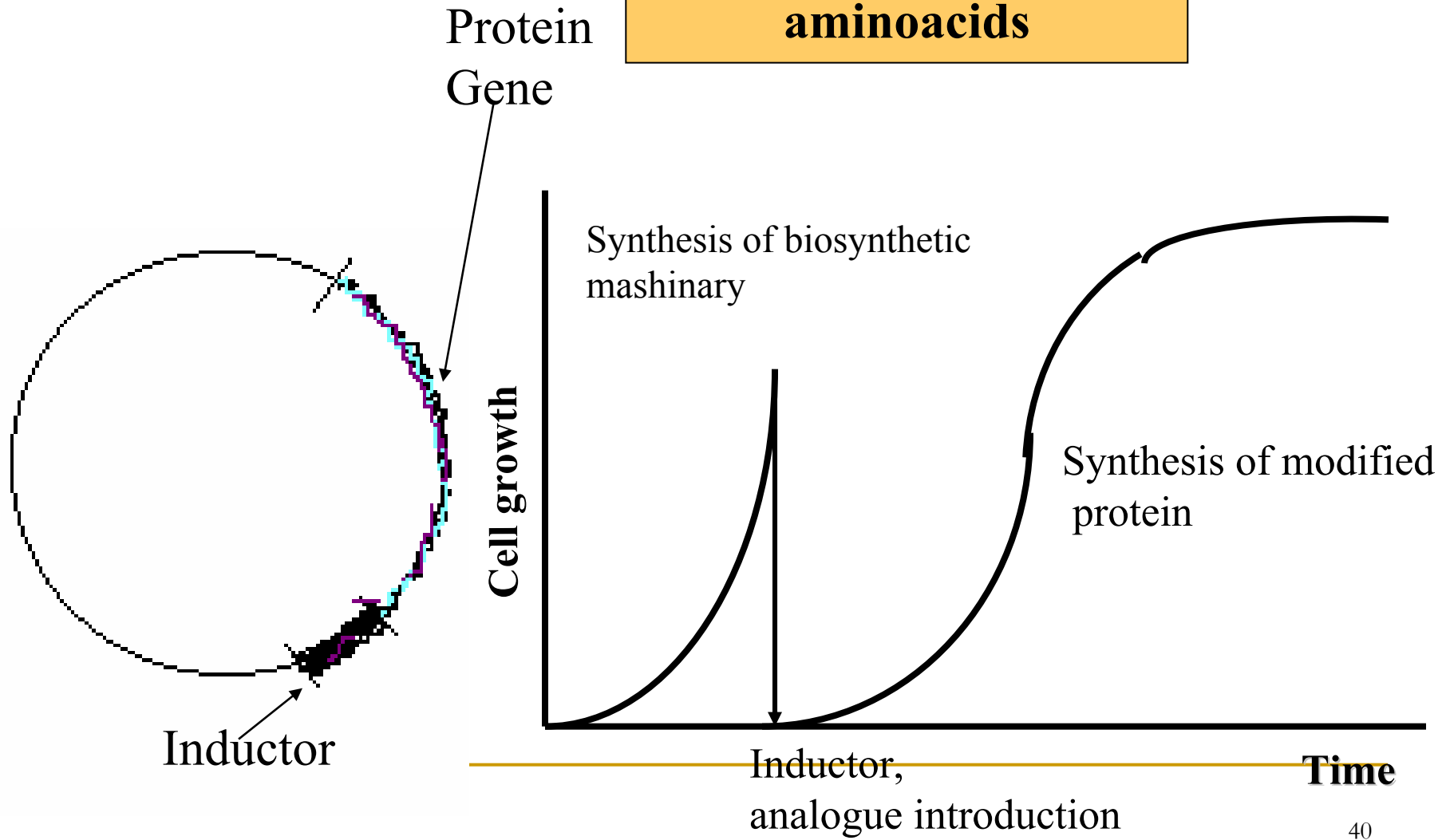
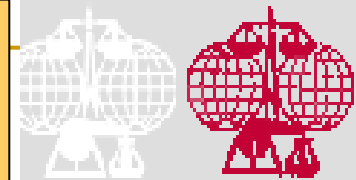
Ферменты могут работать в  
кипящей воде

---

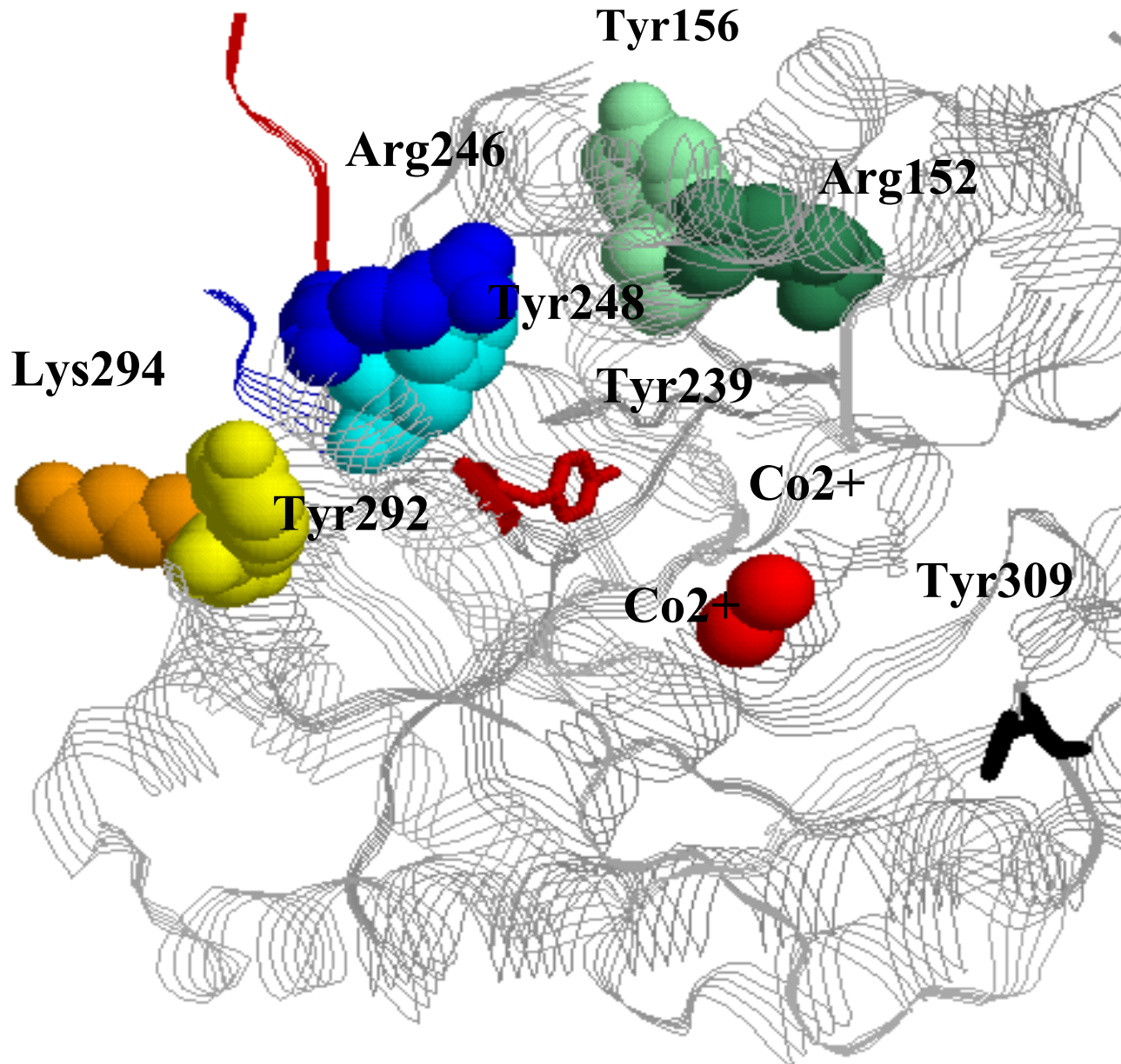




**Gene-expressed proteins  
with  
Organoelementary  
aminoacids**

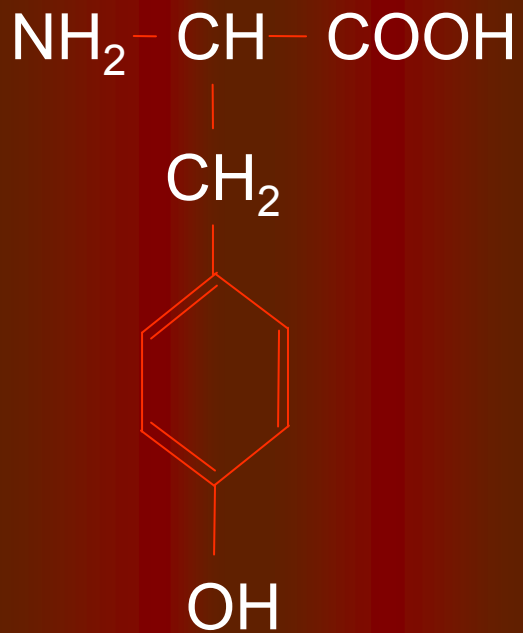


# Tyrosine positions in OPH

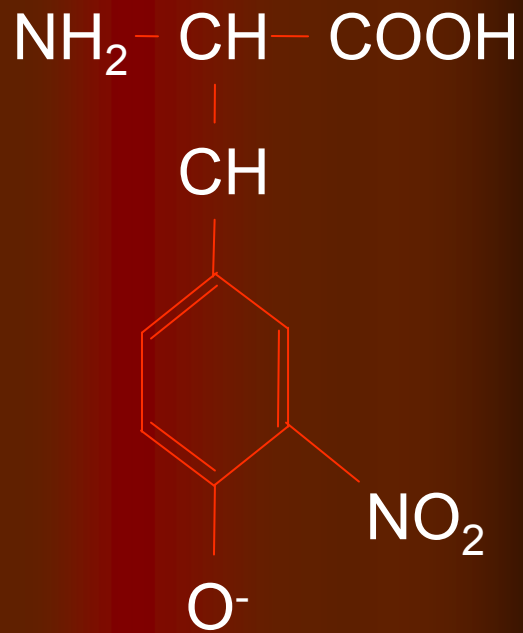




# Тирозин

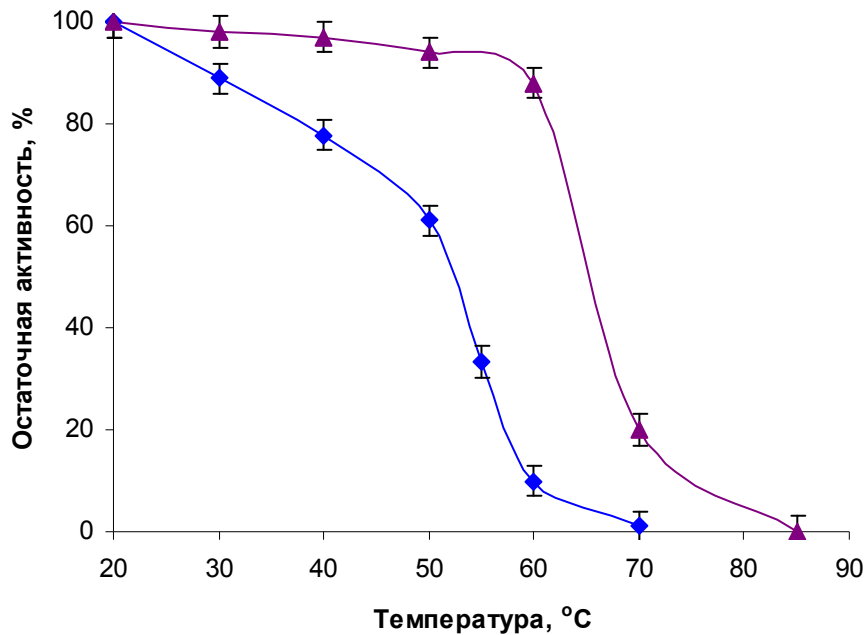
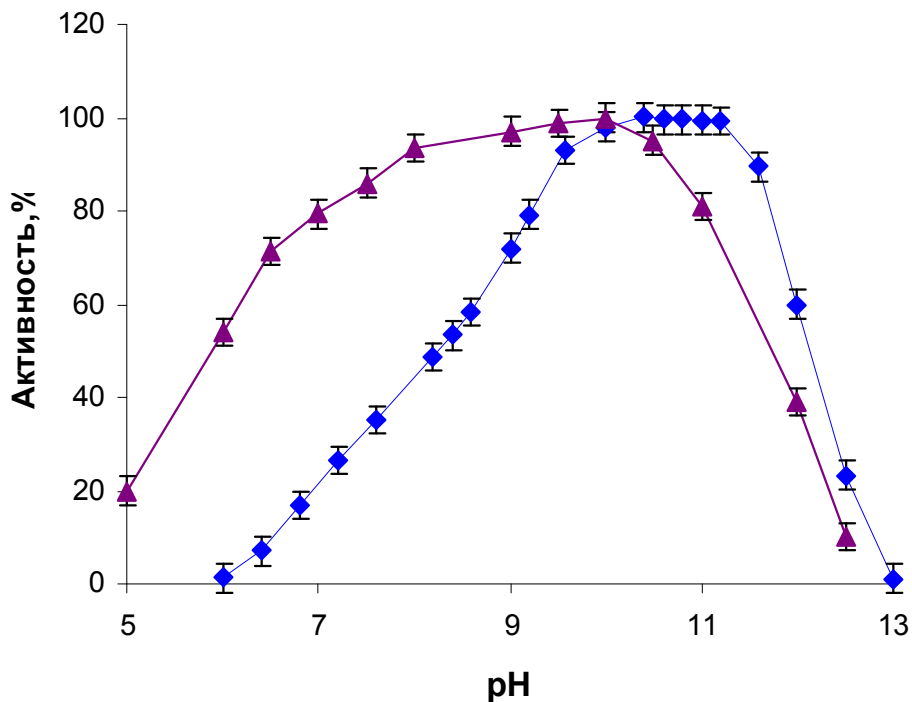


# Нитротирозин



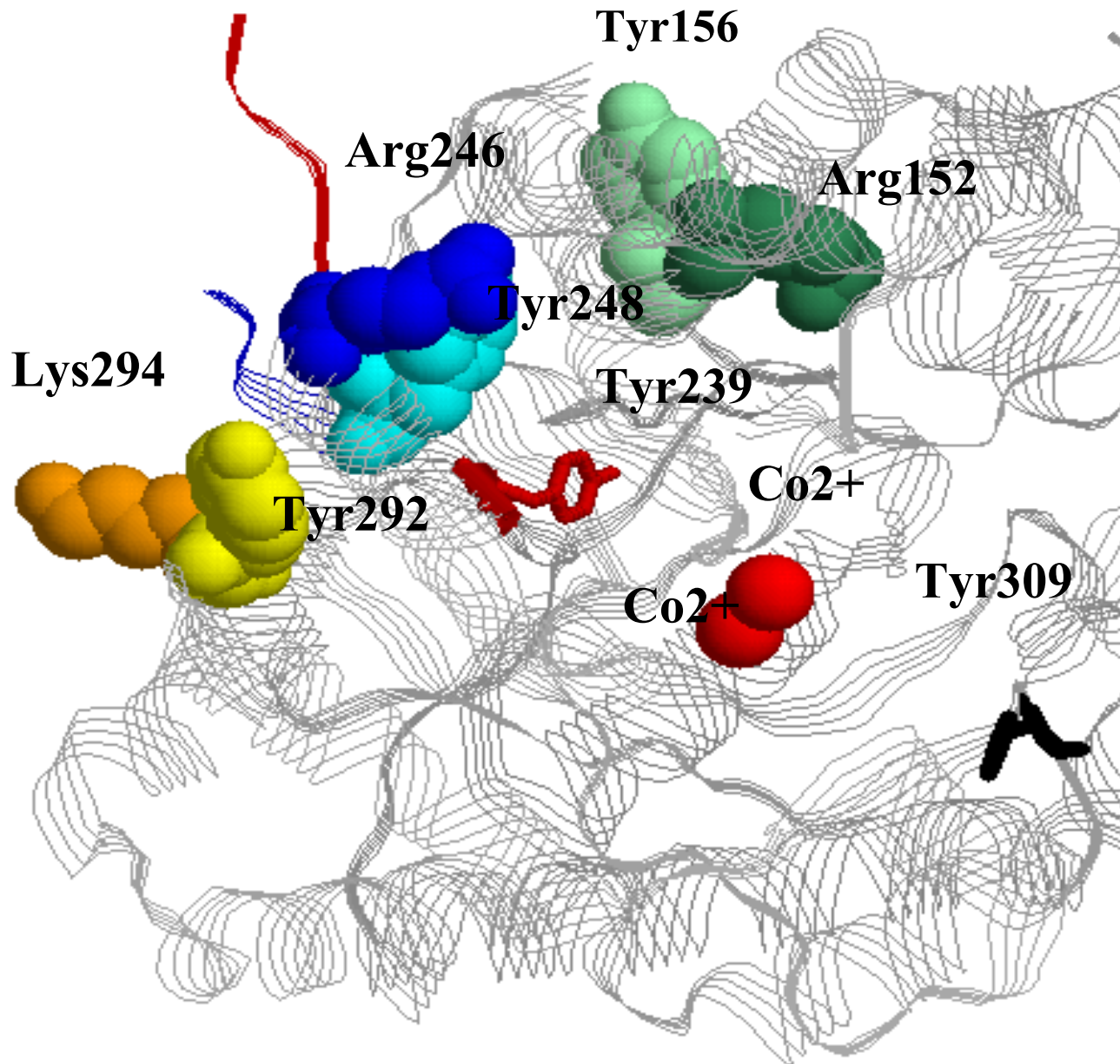
# His<sub>6</sub>-OPH и F-Tyr-His<sub>6</sub>-OPH

## Thermostability His<sub>6</sub>-OPH и F-Tyr-His<sub>6</sub>-OPH



*Fluorine-OPH-thermostable enzyme*

# Tyrosine positions in OPH



---

# Наноразмерные эффекты в белковом катализе

---

***Каталитическую активность можно  
регулировать сжимая и расслабляя  
белковую наночастицу в обращенных  
мицеллах, Н.Л.Клячко***

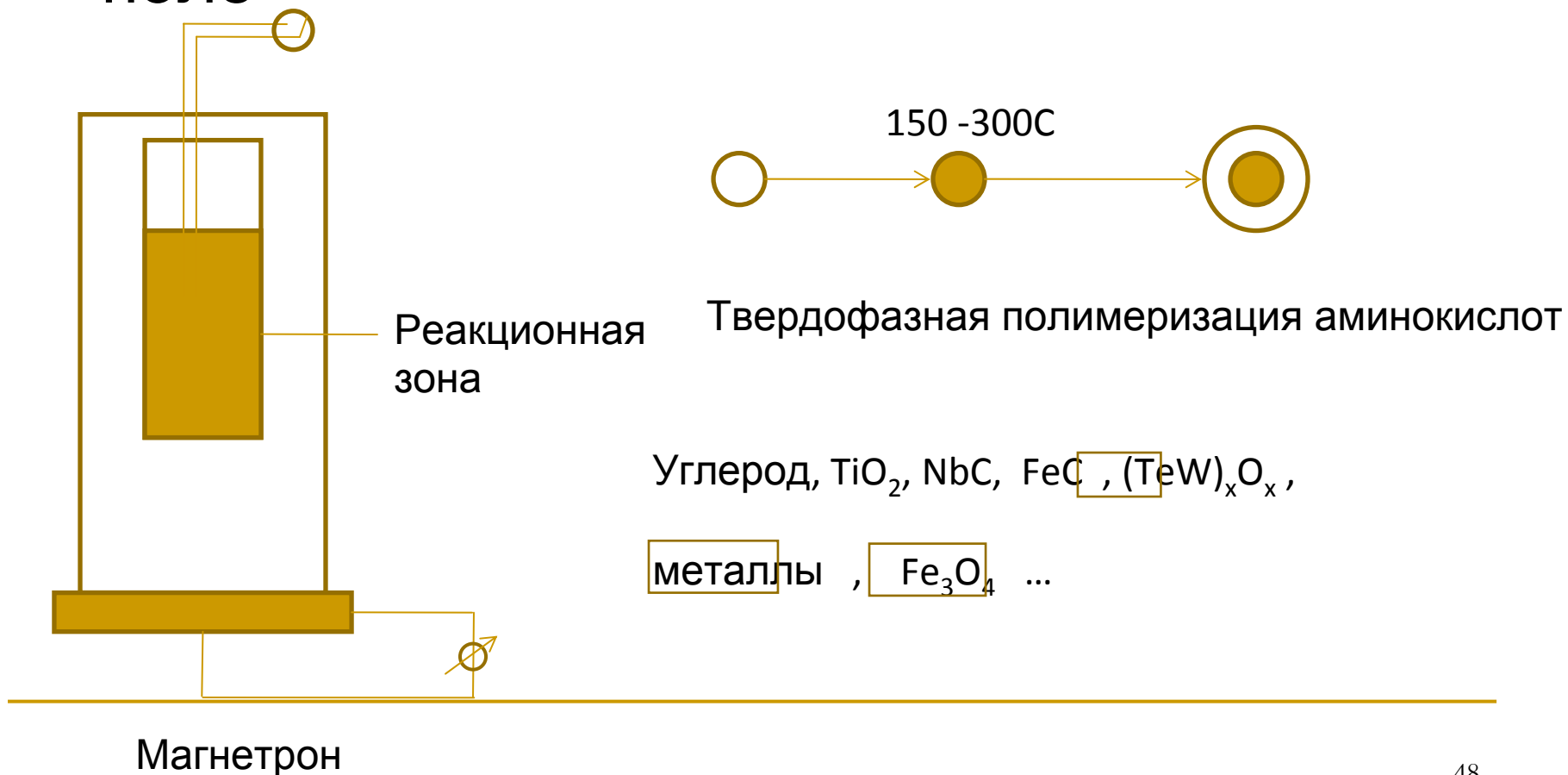
Нанозимы-  
ферментоподобные  
катализаторы, полипептиды,  
иммобилизованные на  
наночастицах

---

Активируемые  
микроволновым  
излучением  
магнитоуправляемые  
ферментоподобные  
катализаторы

# Ферментоподобные нанокатализаторы

Поликонденсация аминокислот на поверхности наночастиц в микроволновом поле

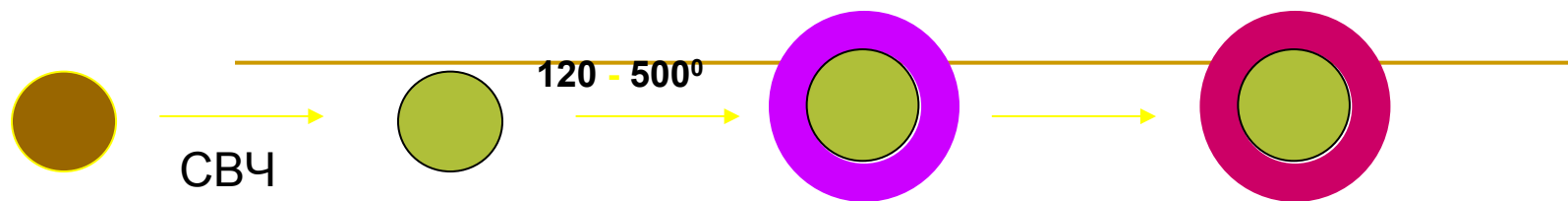




# Наночастицы

(металлы, углерод)

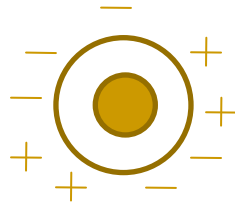
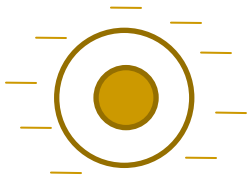
*Функционализация поверхности – поликонденсация в микроволновом поле*



**= введение  $NH_2$ ,  $COOH$  групп**

**= гидрофобизация или гидрофилизация поверхности**

# Ферментоподобные нанокатализаторы



гидрофильные



гидрофобные

Asp

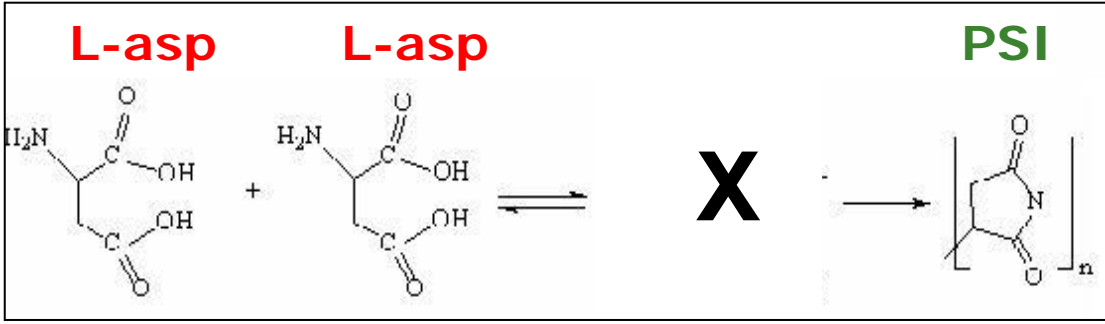
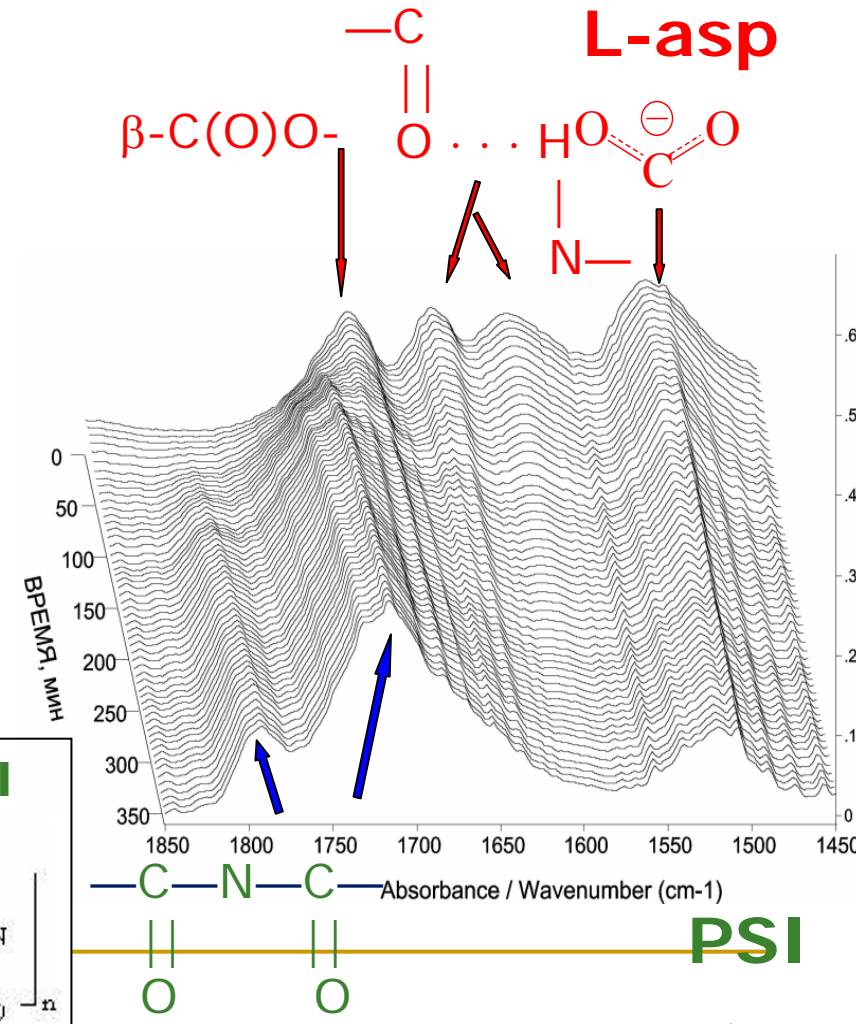
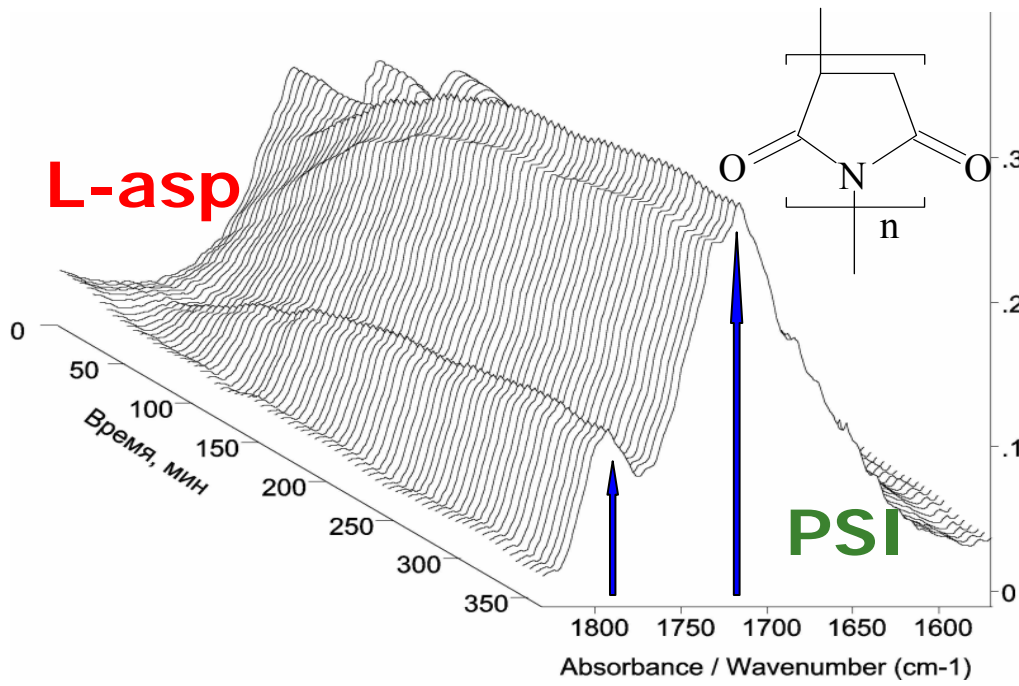
(Asp, Lys) (Asp, Arg)

(Asp Gly) (Asp Gly Arg), Asp  
Ser

(His Ser)(His Ser Gly)

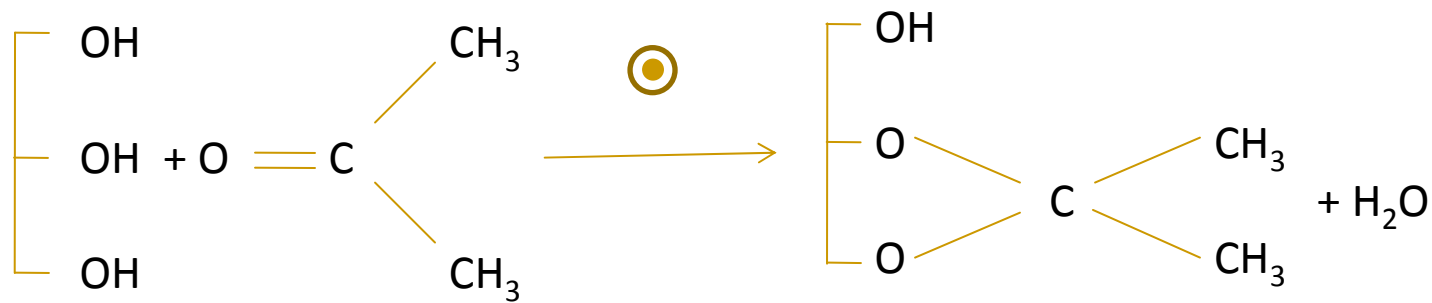
...

# FTIR spectroscopy in real time, 215°C



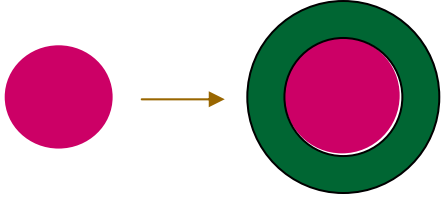
# Ферментоподобные нанокатализаторы

## Синтез биодобавок, повышающих октановое число бензинов



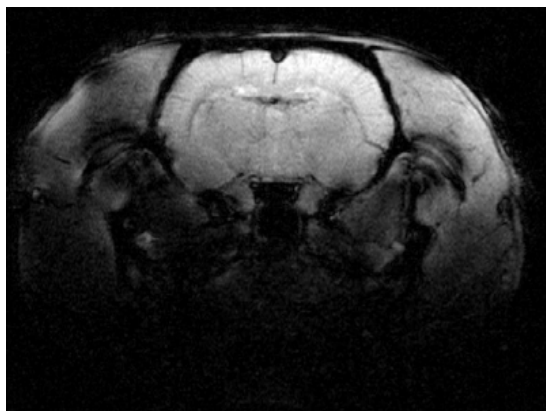
Реакция в органическом растворителе

# Ферромагнитные (суперпарамагнитные) наночастицы в центральной нервной системе

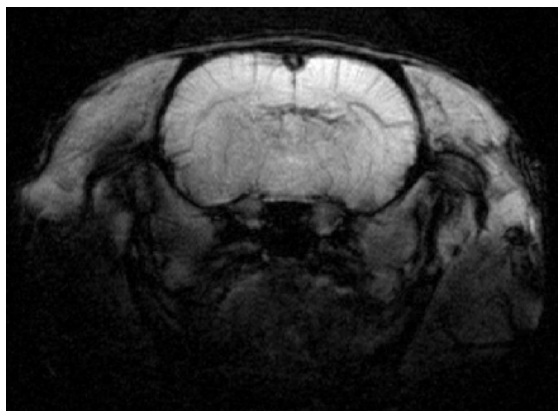
1. -  *Гидрофобная поверхность*
2. - *Контрастирующий агент в ЯМР-томографии*
3. - *Направленный перенос в мозг и другие органы  
и ткани*
4. - *Ответ в микроволновом поле*
5. - *Ответы в различных частотах переменного  
магнитного поля*

# Магнитоуправляемые наночастицы

Контроль



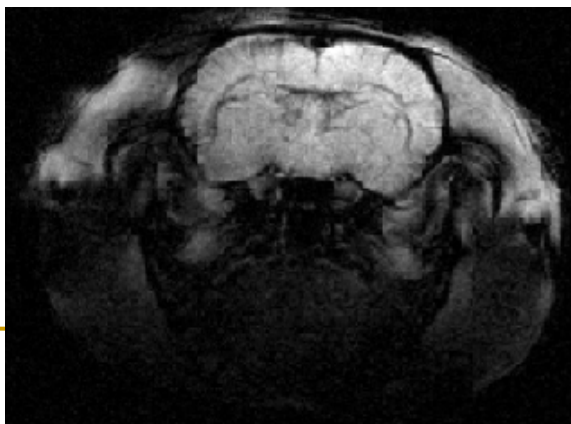
i/v



Модифицированные  
ферромагнитные  
наночастицы в  
организме

***Магнитно-  
резонансная  
томография***

i/a



Увеличение  
ферромагнитных  
наночастиц в мозге



---

# *Biocatalysis and Nanotechnology*

Sergey Varfolomeev

---

*N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics,  
Russian Academy of Sciences*

*Department of Chemistry, Moscow State  
University*