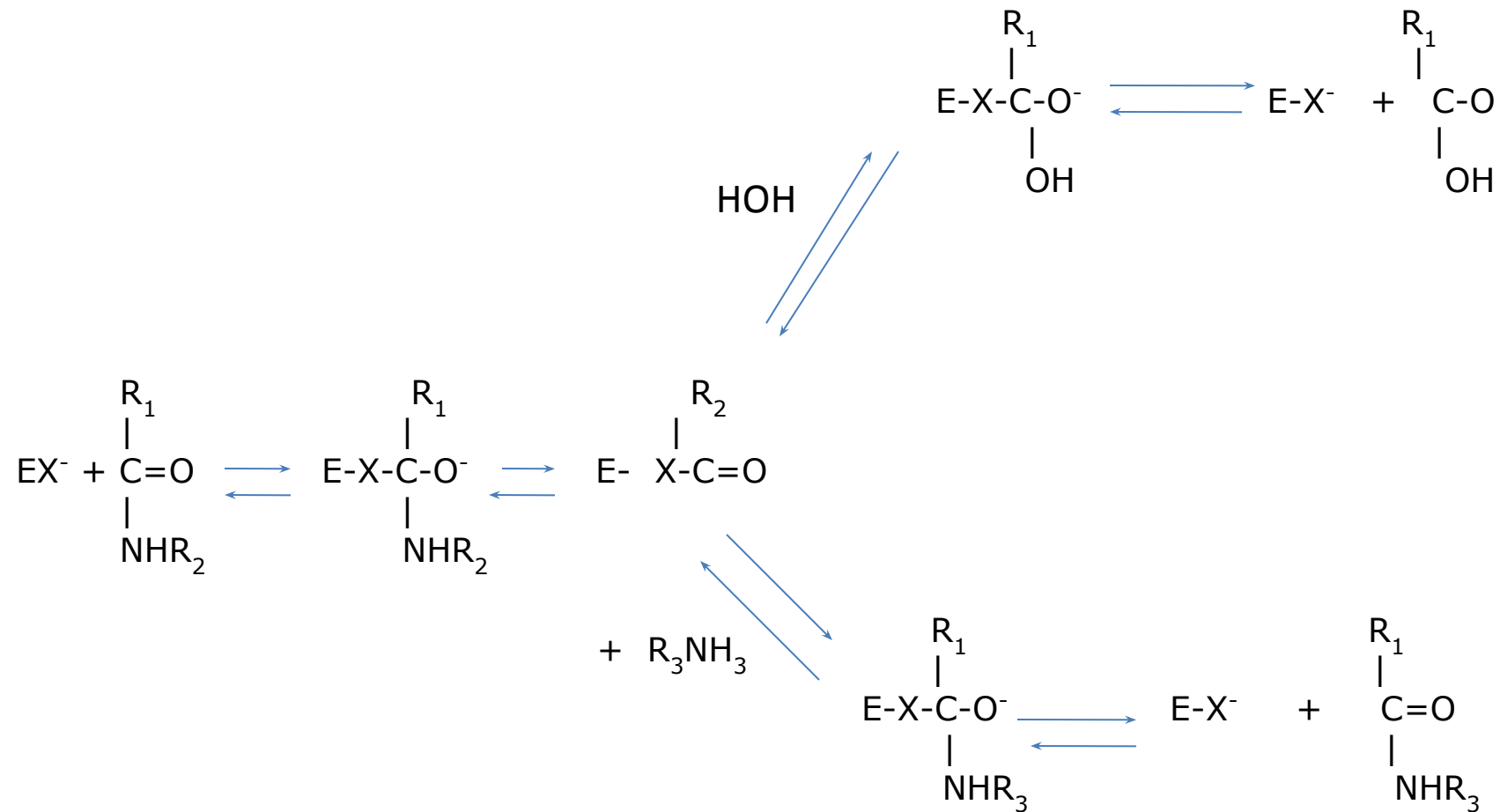
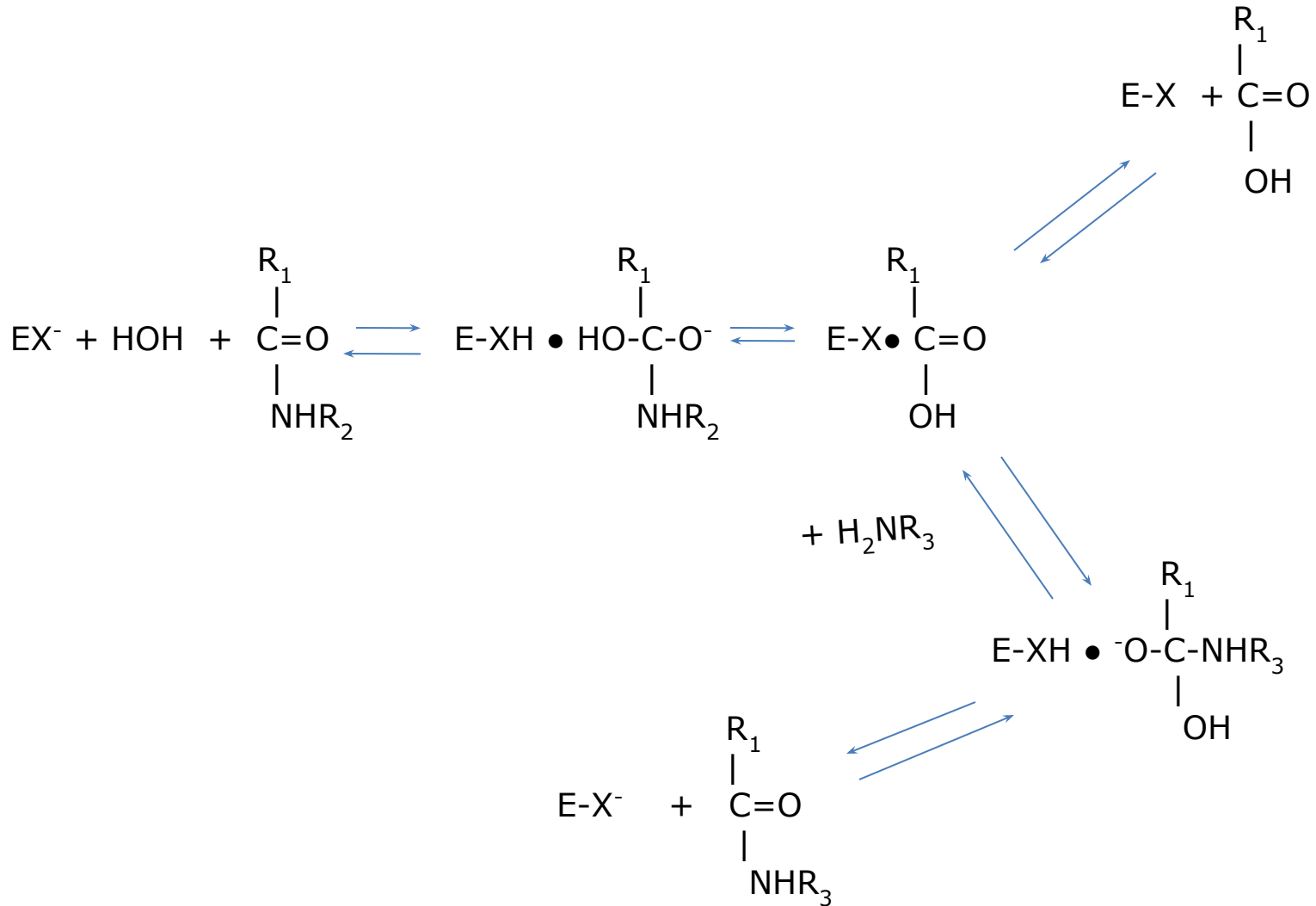


Ферменты в биотехнологии

НУКЛЕОФИЛЬНЫЙ КАТАЛИЗ

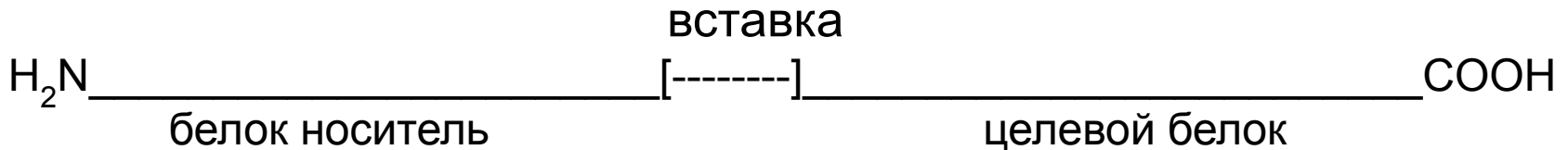


ОБЩИЙ ОСНОВНОЙ КАТАЛИЗ



Гидролиз химерных белков

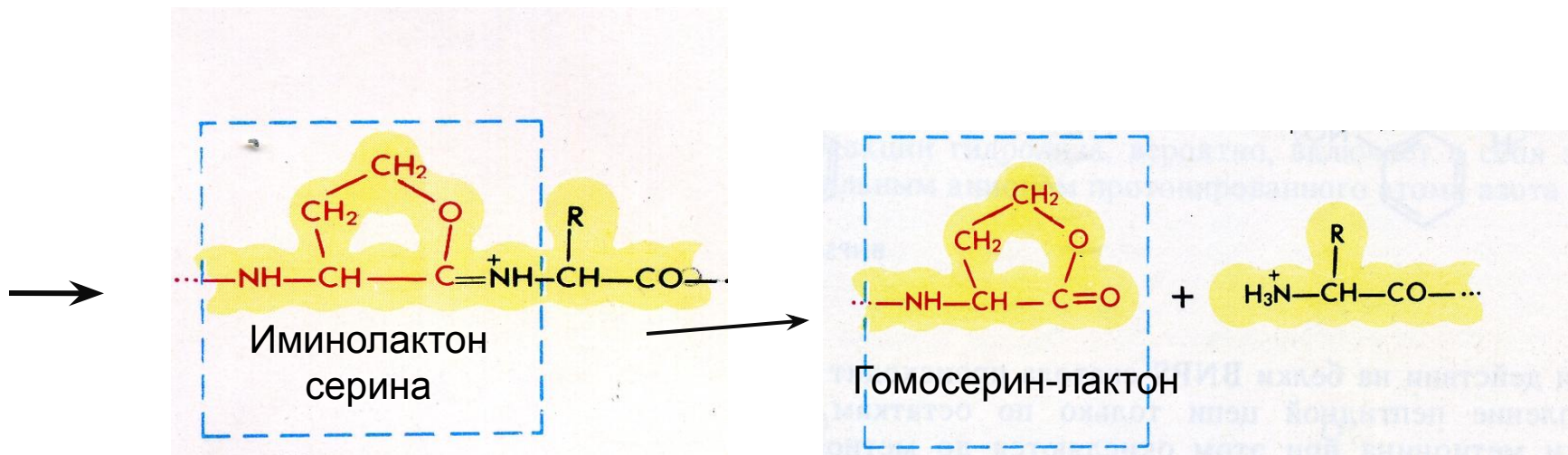
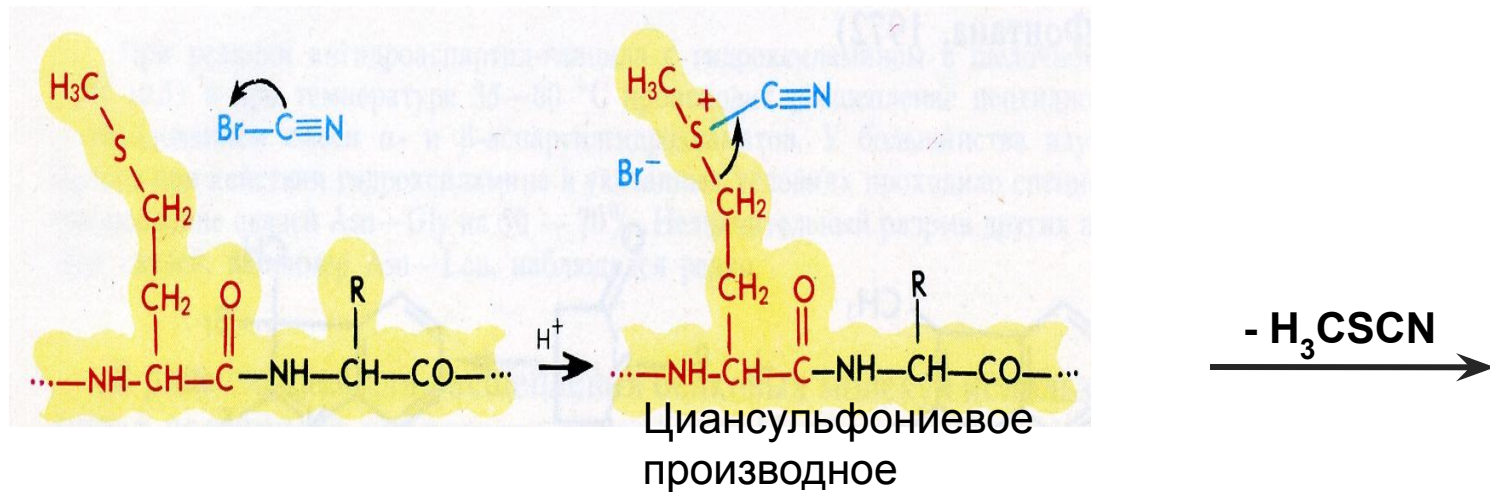
Во многих случаях рекомбинантные белки удобнее получать в виде химерных белков.



• *Химические методы*

а) Расщепление BrCN после остатка **Met**.

Бромциан расщепляет пептидную связь, образованную остатком Met, превращая последний в гомосеринлактон.

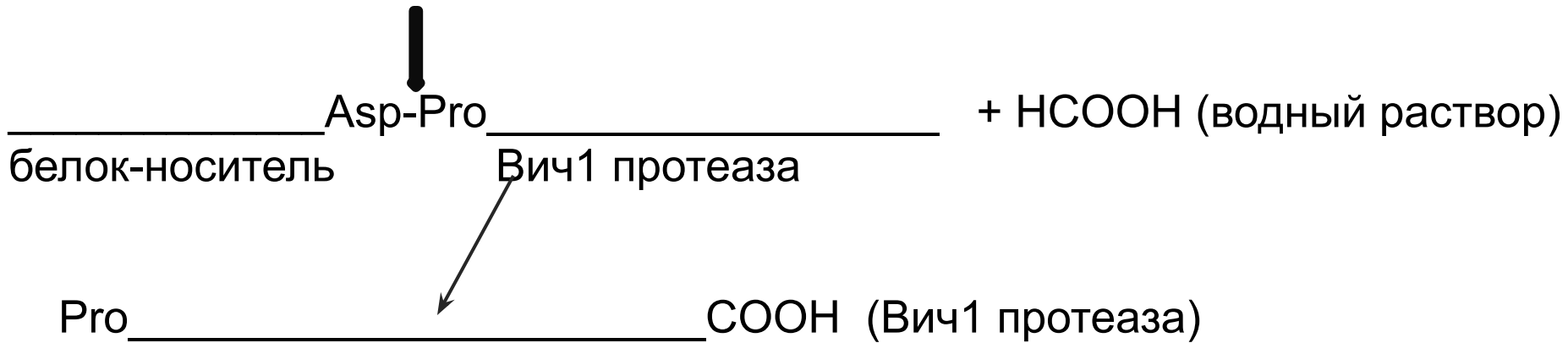


100 кратный избыток BrCN, 70% HCOOH, время до 30 часов, комн. т-ра

б) кислотное расщепление химерного белка по связи Asp---Pro

Метод может быть использован в случае, если целевой белок начинается с остатка Pro.

Получение ВИЧ1 протеазы.



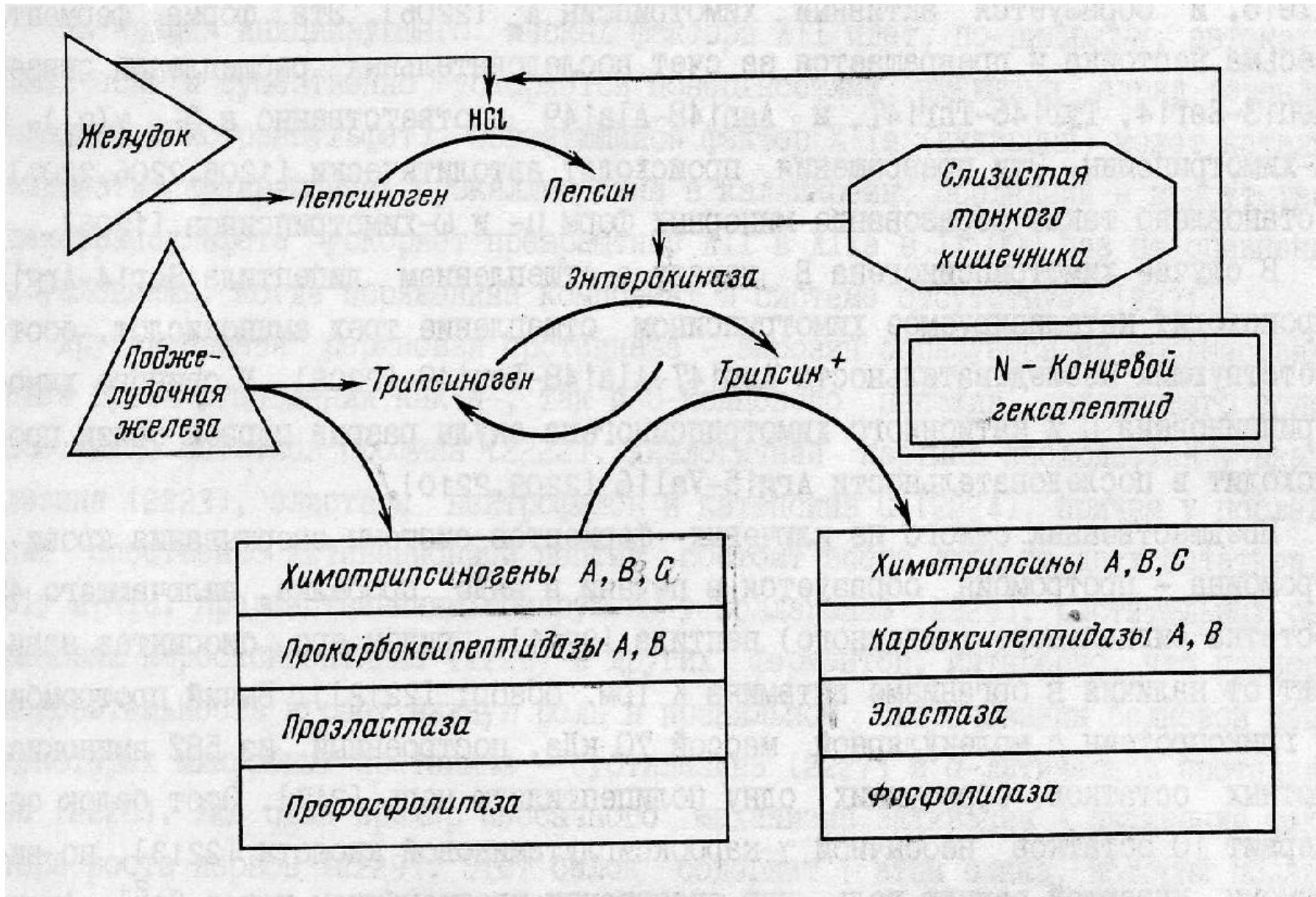
• Ферментативное расщепление химерных белков

Для этого требуются высокоспецифические ферменты.

Трипсин (Lys, Arg), **химотрипсин** (Phe, Tyr, гидрофобные а.к.),

протеаза V8 (Glu, Asp)

Схема активации зимогенов пищеварительных ферментов



а) энтеропептидаза

Выделяется из слизистой тонкого кишечника.

Ее роль – активация каскада пищеварительных ферментов (зимогенов).

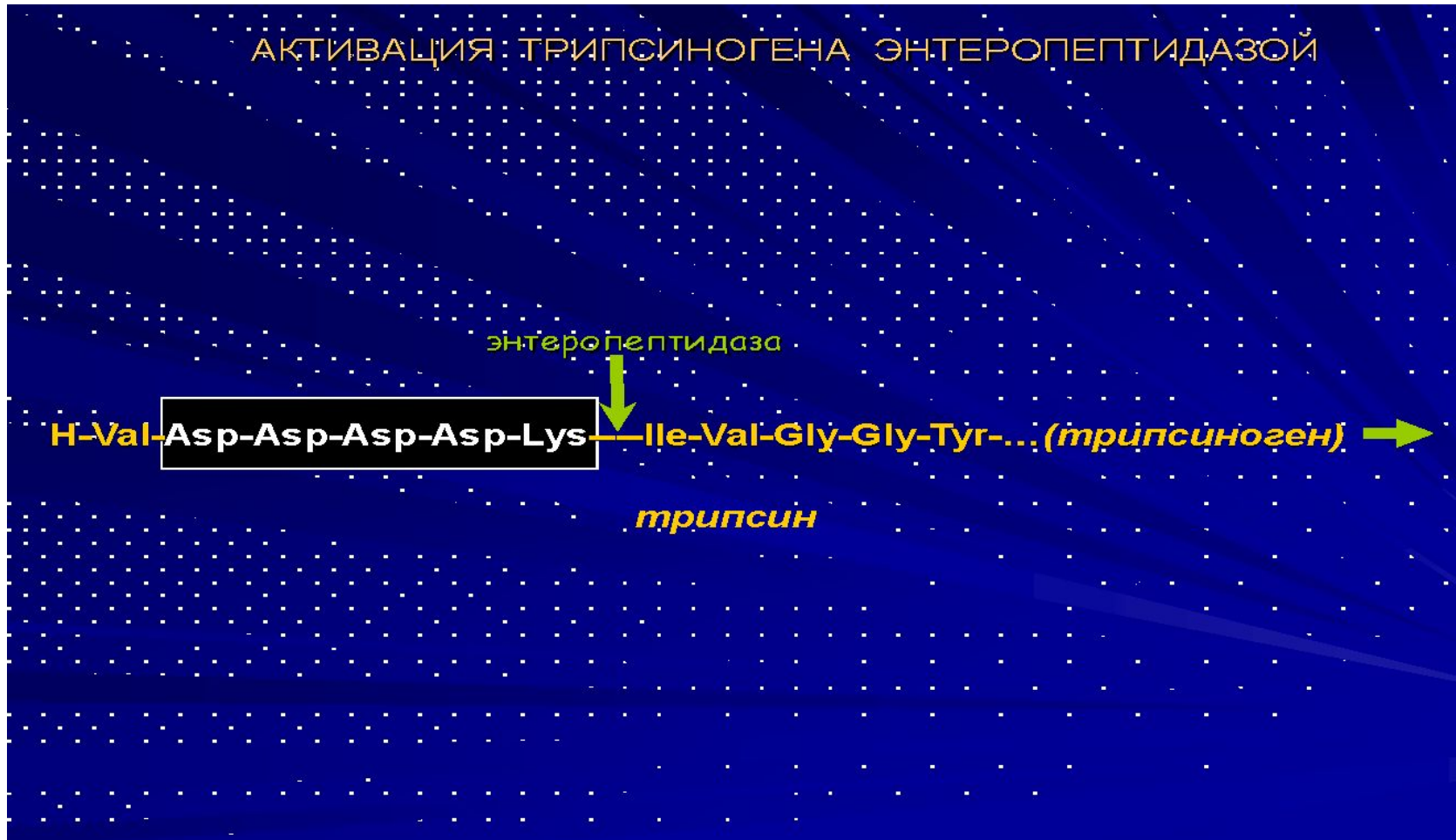
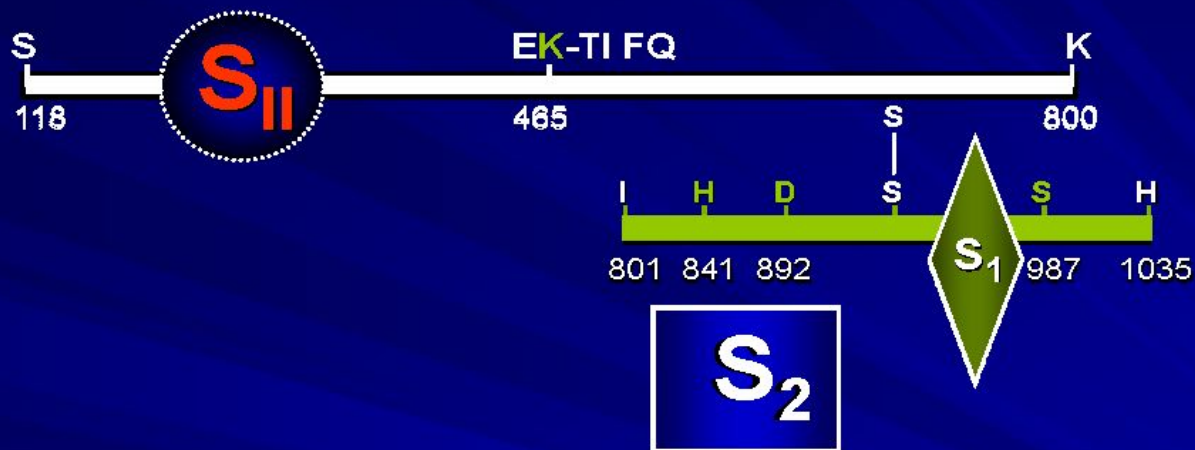


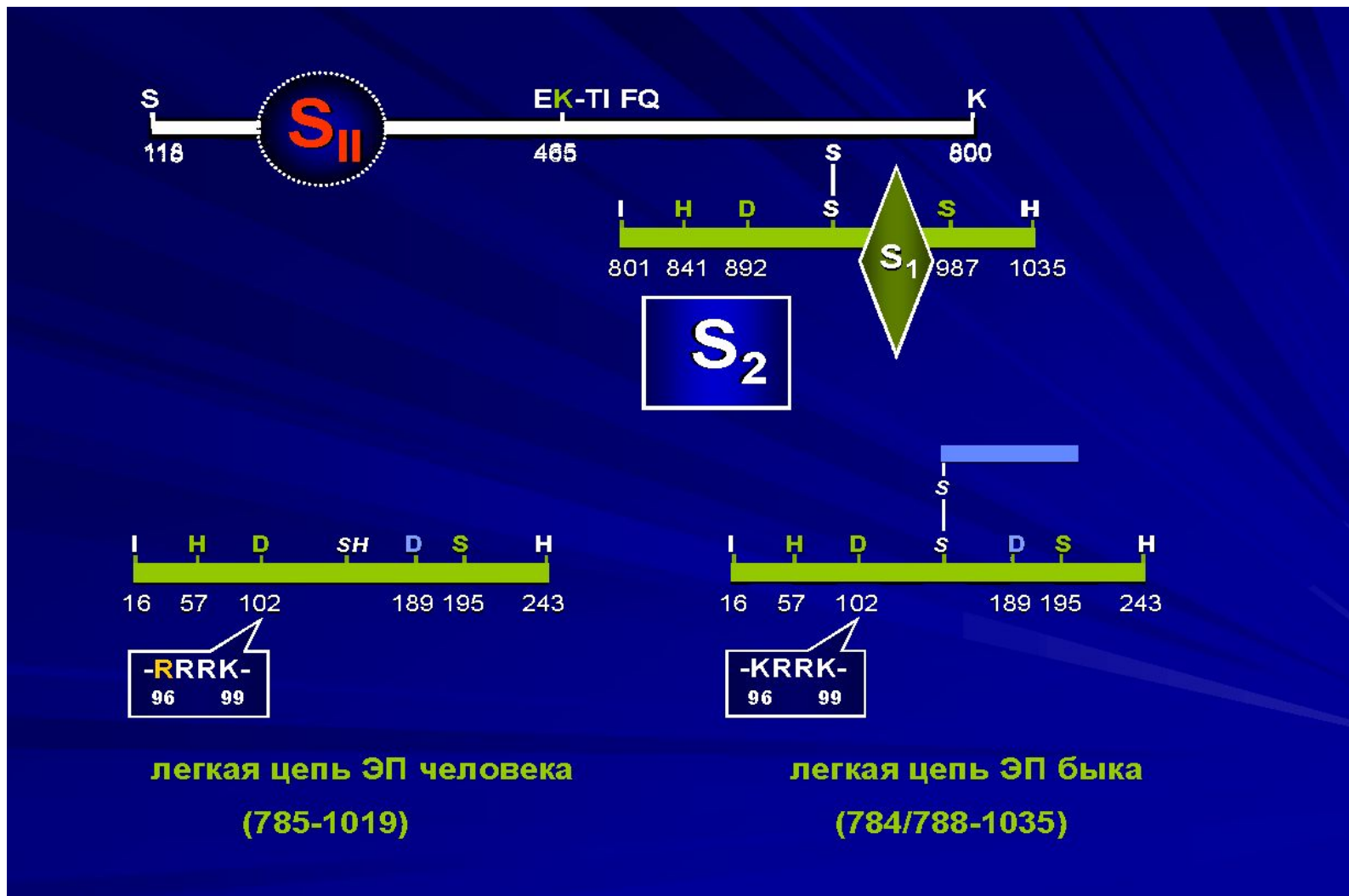
СХЕМА СТРОЕНИЯ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ (КФ 3.4.21.9)



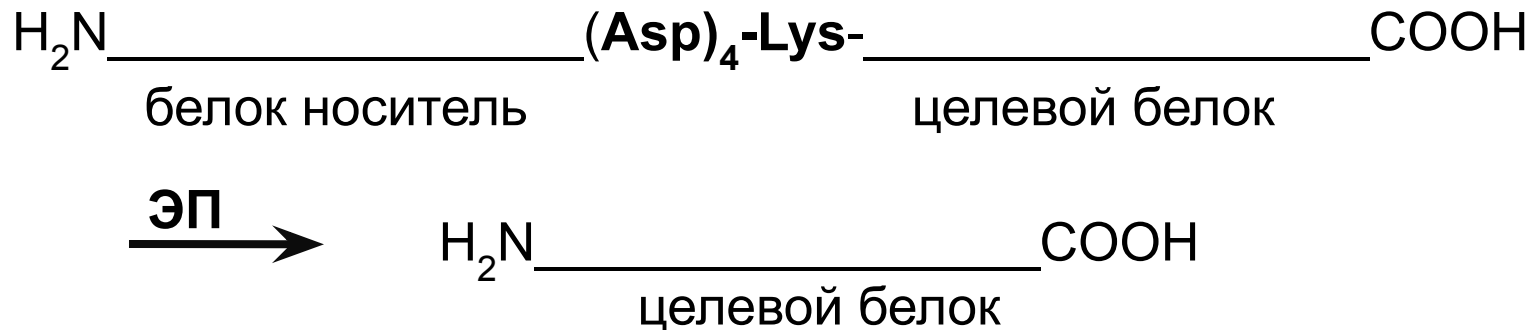
Субстрат-связывающие центры
легкой цепи энтеропептидазы



Первые эксперименты проводились с энтеропептидазой быка, выделенной из слизистой тонкого кишечника. Энтеропептидаза быка получена в виде рекомбинантного белка.



Легкая цепь используется для гидролиза химерных белков.



Однако в некоторых случаях происходит дополнительный гидролиз после остатка Lys в последовательностях – **X-X-X-X-Lys-** , где один или два остатка Asp или Glu.

Укороченные формы энтеропептидазы не активируют трипсиноген.

б) тромбин

Расщепляет пептидные связи в белках по карбоксильной группе аргинина в последовательности –

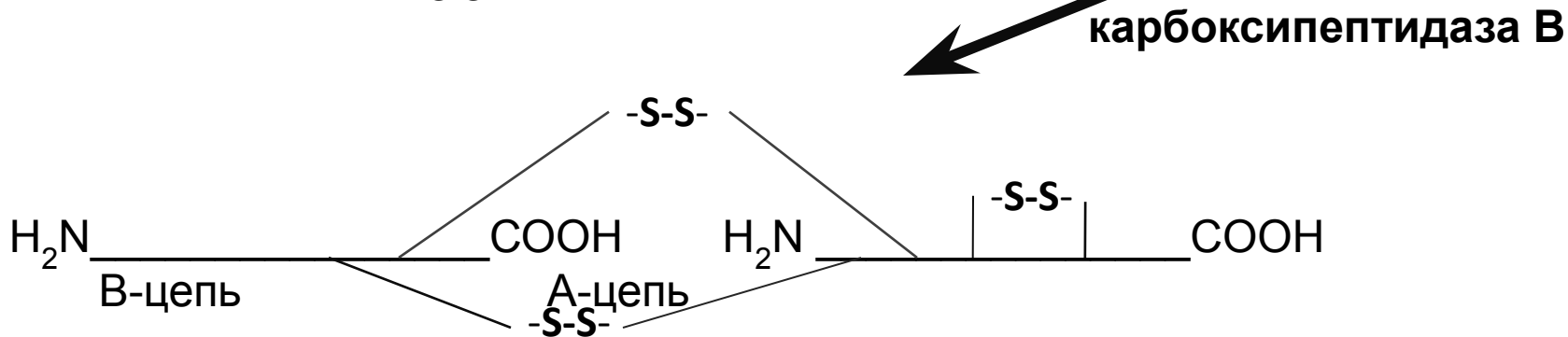
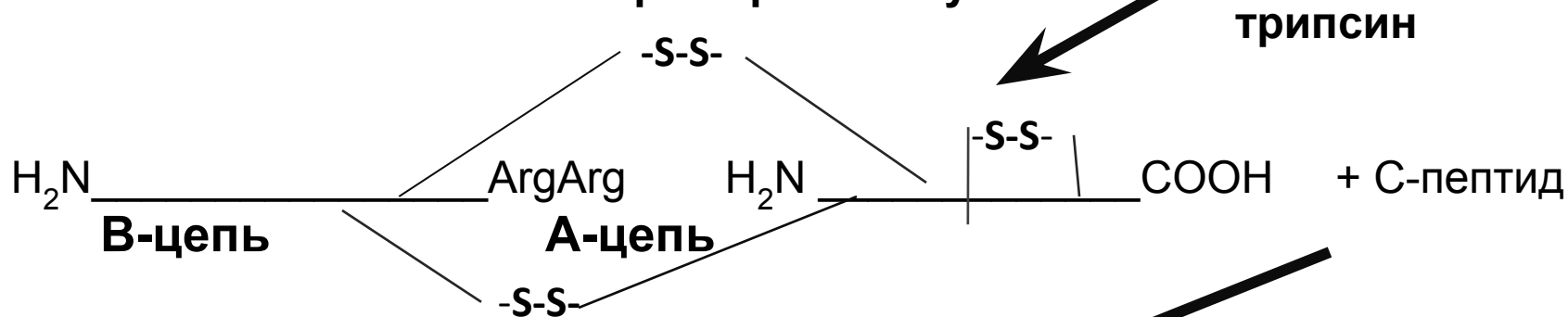
Glu-Val-Arg-Gly-Pro-Arg-

в) протеазы, расщепляющие после пары положительно заряженных аминокислотных остатков.

Протеаза гена KEX-2 дрожжей проявляла специфичность к последовательностям:

Arg-Arg-, Lys-Lys-, Lys-Arg-, Arg-Lys

Получение инсулина



ПОЛУЧЕНИЕ АМИДОВ ПЕПТИДОВ

Многие биологически активные пептиды являются амидами по С-концевой карбоксильной группе.

Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH₂ - дерморфин А;

Глюкагон -----Thr-NH₂ - 29 ак, гормон поджелудочной железы, связан с обменом углеводов;

Гастрин -----Phe-NH₂ - 17 ак. связан с секрецией желудком соляной кислоты;

Холецистокинин-панкреозимин -Phe-NH₂ - 33 ак. связан с секрецией пищеварительных ферментов;

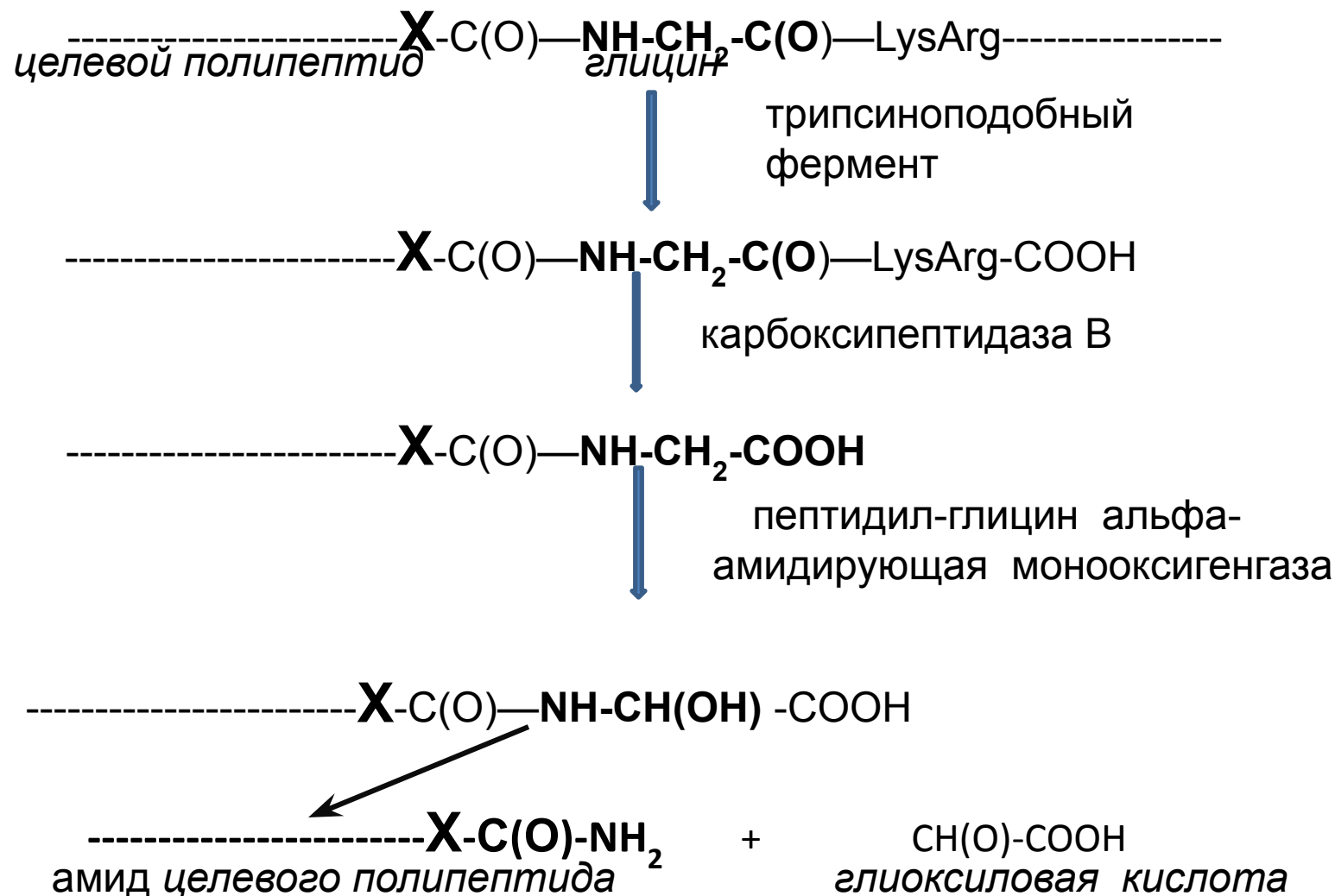
Секретин -----Val-NH₂ 27 ак. связан с деятельностью желудочно-кишечного тракта.;

Кальцитонин -----Pro-NH₂ 32 ак.

обладает мощными гипокалиемическими действием, продуцируется клетками щитовидной железы. Он обеспечивает поддержание постоянного уровня кальция в крови и предотвращает разрушение костной ткани.

Кальцитонин применяют при лечении различных системных заболеваний, таких как - спонтанное рассасывание костей, некроз головок бедренных костей, различные виды остеопороза, осложненное течение травматического поражения костей, пародонтозе и т.д.

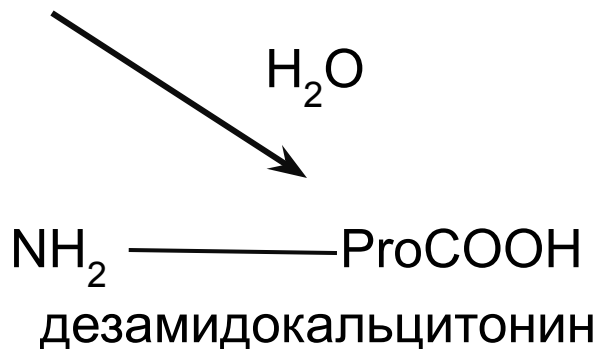
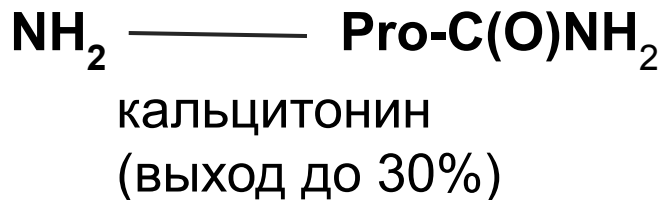
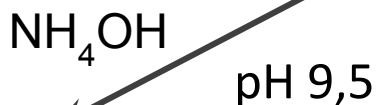
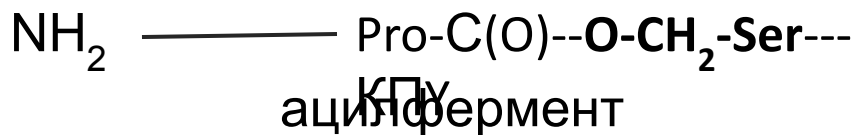
Как происходит образование амидов пептидов in vivo?



Амидирование с помощью реакции транспептидации

в присутствии карбоксипептидазой Y (КПУ).

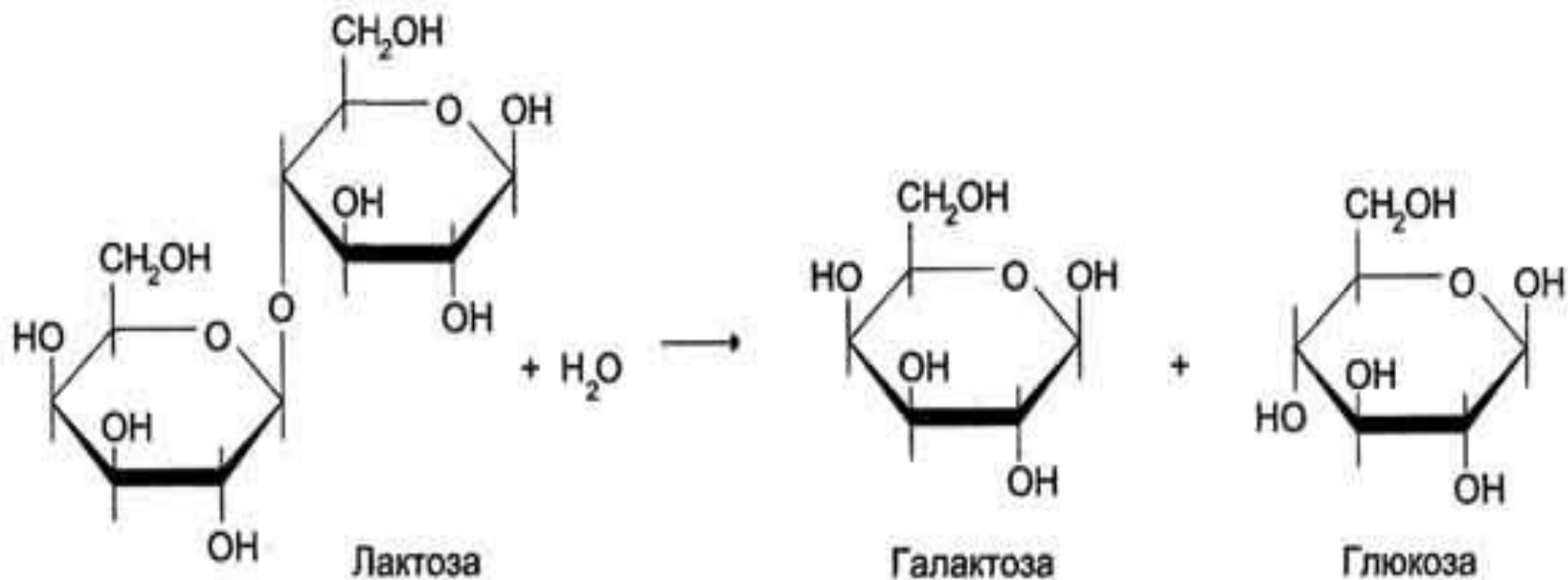
КПУ - сериновая протеаза с широкой специфичностью и широким диапазоном pH



Гидролиз лактозы

Непереносимость молочного сахара достаточно распространенное явление. В Швеции и Дании непереносимость лактозы примерно у 3 % взрослых лиц, в Финляндии и Швейцарии — у 16 %, в Англии — у 20-30 %, во Франции — у 42 %, в странах Юго-Восточной Азии и у афроамериканцев в США — почти у 100 %

Ферментативный гидролиз лактозы проводится с помощью β -галактозидазы



МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ

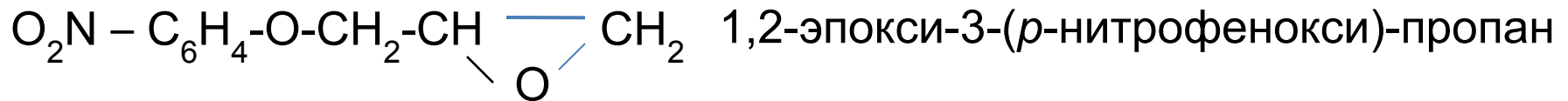
ХИМОЗИН (реннин, сычужный фермент), фермент класса гидролаз, катализирующий гидролиз пептидных связей по остаткам гидрофобных АК.

Мол. м. бычьего химозина ок. 35 000, оптимум pH 3-4. Активный центр химозина содержит два остатка аспарагиновой к-ты, избирательно модифицируемых эпокси- и диазо-соединениями.

Образуется химозин в слизистой желудка телят.

ингибитор - пепстатин) Iva-Val-Val-Sta-Ala-Sta

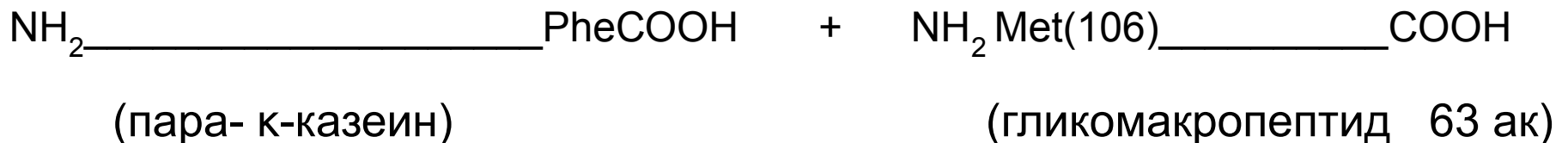
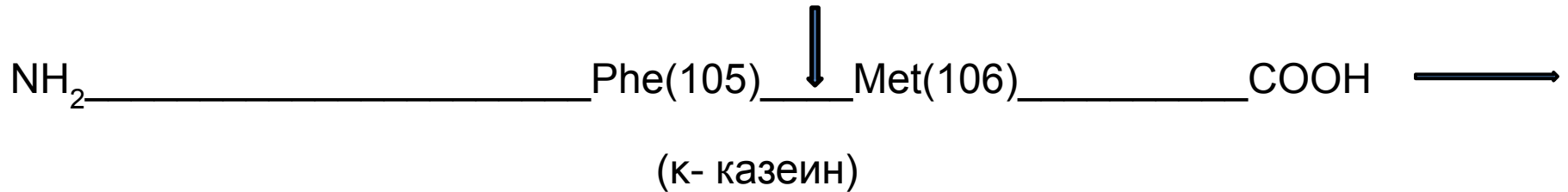
- +

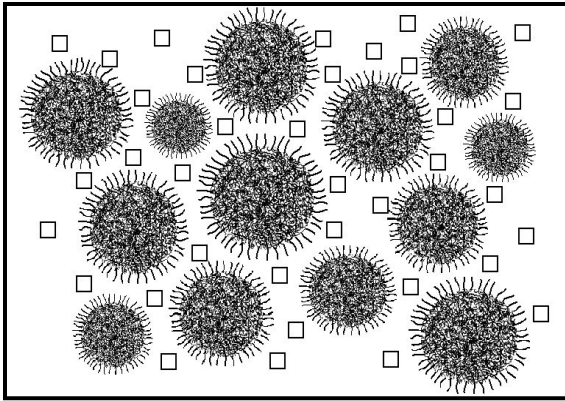


казеин

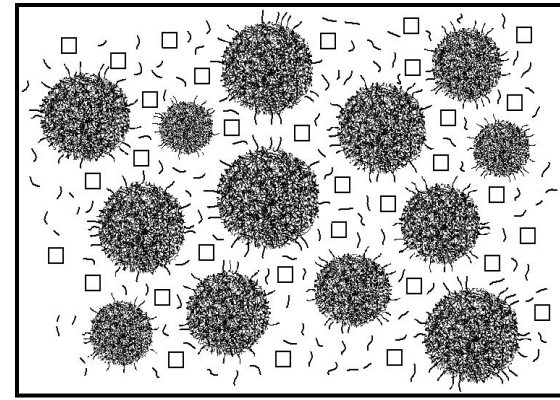
КАЗЕИН (от лат. caseus - сыр), основная. белковая фракция молока; относится к запасным белкам. Представляет собой смесь α -, β -, κ - и γ -казеинов в соотношении - 54,2, 30, 13,3 и 2,5%. Мол. массу ок. 20 тыс., изоэлектрич. точка (pI) ок. 4,7. Содержат повышенное количество пролина, полипептидная цепь имеет β -структуру. Остатки фосфорной к-ты (обычно в виде Са-соли) образуют сложноэфирную связь гл. обр. с гидроксигруппой остатков серина.

ХИМОЗИН

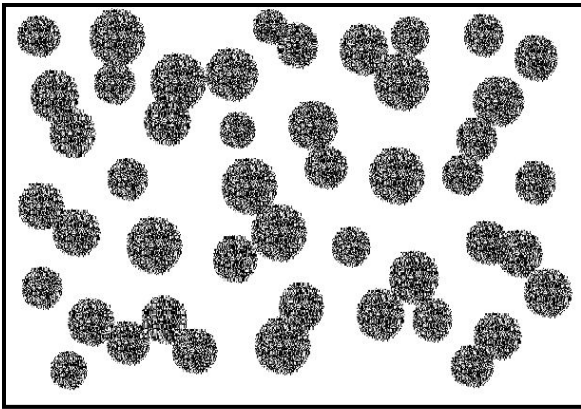




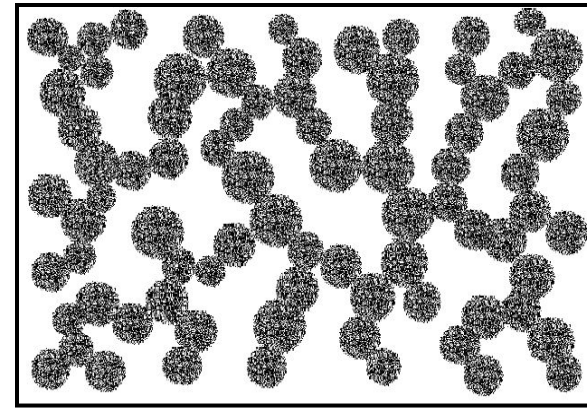
А



Б



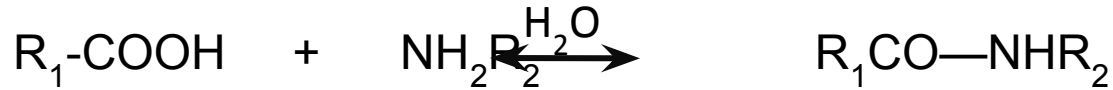
В



Г

А – стадия внесения молокосвертывающего фермента (\square); Б – стадия ферментативного гидролиза связи Phe105-Met106 в молекуле каппа-казеина ("состригание" волоскового слоя); В – стадия начальной агрегации дестабилизированных мицелл, с образованием небольших кластеров; Г – стадия гелеобразования

Ферменты в пептидном синтезе



равновесие реакции сдвинуто в сторону гидролиза

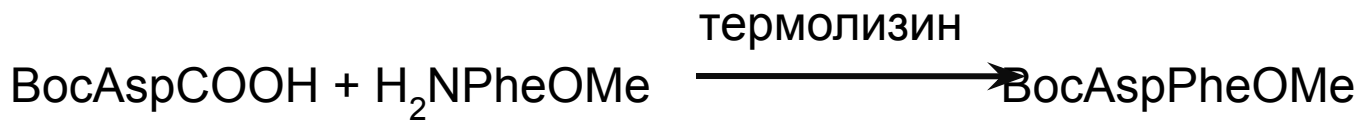
Как сдвинуть равновесие реакции в сторону синтеза?

а) продукт реакции должен быть растворим хуже исходных реагентов и выпадать в осадок;

б) проведение реакции в двухфазной системе.

Например, вода / хлороформ. Фермент и исходные продукты находятся в водной фазе. Продукт растворим в органической фазе

Получение аспаптама (Asp-PheOMe)



AspPheOMe выход 95%

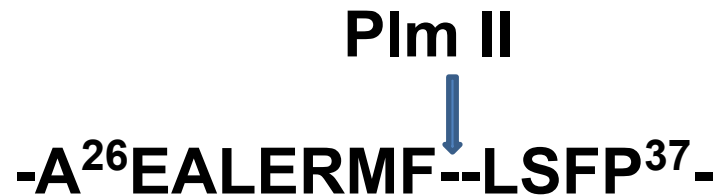
термолизин - металлопротеиназа (мол. м. 34,6 тыс.)
продуцируется бактерией *Bacillus thermoproteolyticus*.

Ингибиторы ферментов – лекарственные препараты

Малярия вызывается простейшими паразитами рода Plasmodium (80—90 % случаев — Plasmodium falciparum).

Ключевым фактором выживаемости паразита является присутствие в его клетках аспартильных протеиназ, называемых **плазмепсинами** (PlmI–PlmIV).

Пищевой ресурс паразита – гемоглобин



Специфическая инактивация плазмепсина должна приводить к полному нарушению метаболизма паразитарных клеток и быстрой гибели паразита

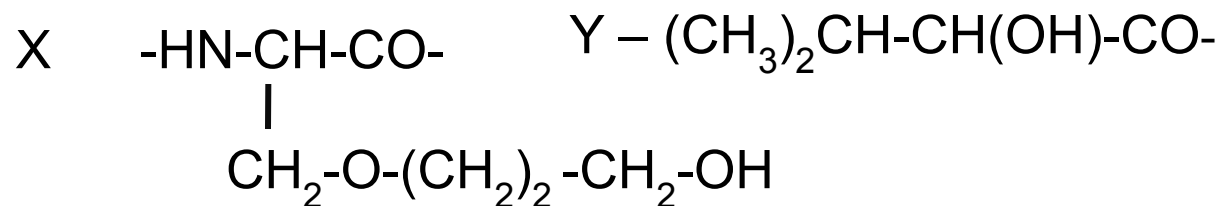
Pst (пепстатин) Iva-Val-Val-Sta-Ala-Sta, ингибитор аспартильных протеаз

Sta - статин, гамма аминокислота -
 $\text{HN-CH}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{COOH}$

Ингибирование плазмепсина II (pH 4.4) и катепсина D человека (pH 3.5) при гидролизе субстрата CS; [S] 60мкМ, 0.1 М Na-формиатный буфер, 37⁰С

ингибитор	K_i , пМ	
	Plm II	Cat D
Pst	2.75	3.77
I-1	2.15	4.00
I-2	3.54	4.32
I-3	157	3000
I-4	5.49	235
I-5	5.03	3020

Структура ингибитора **I-5** - Y-Val-Val-Sta-X-Sta-OH:



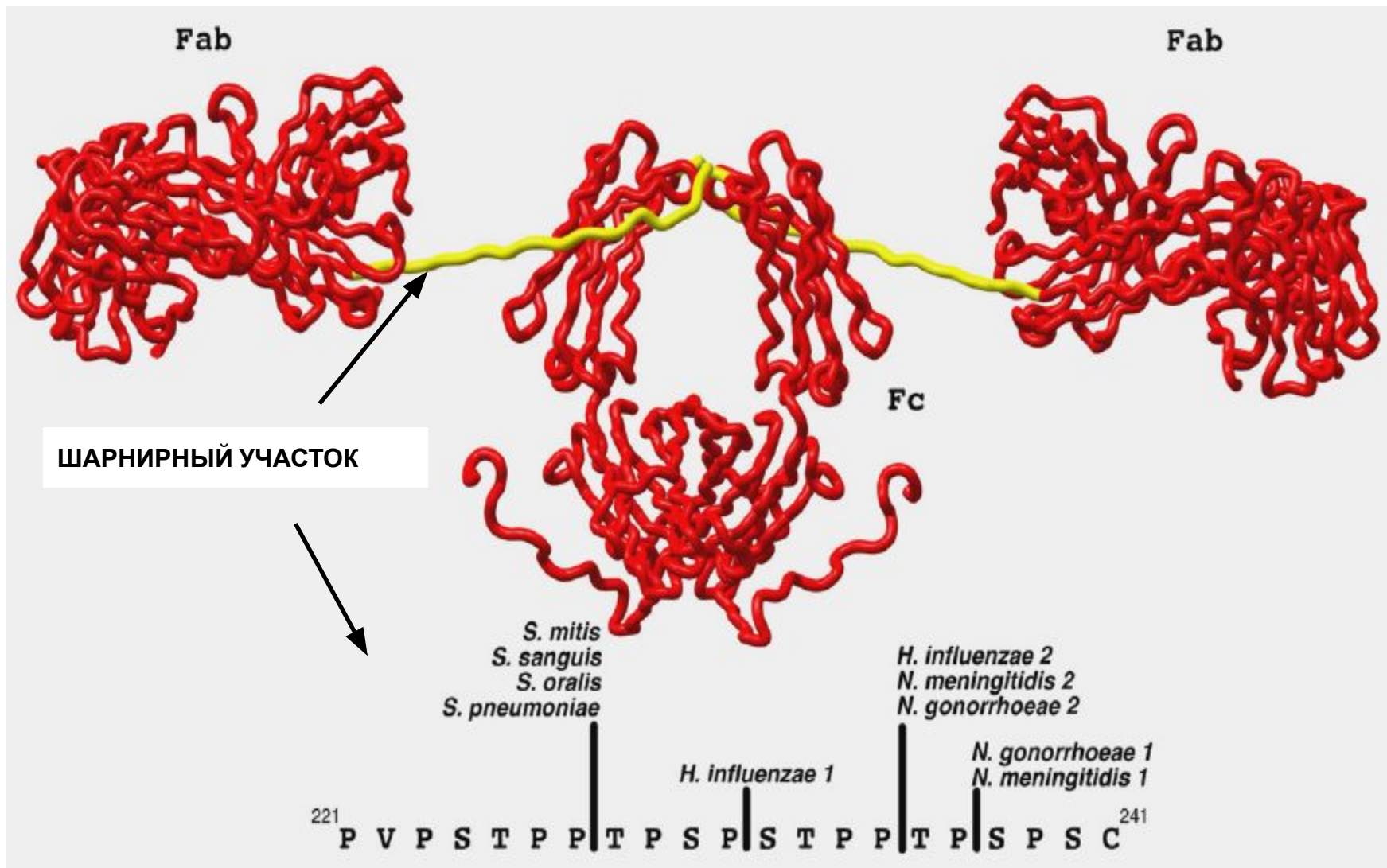
Менингит

На сегодняшний день менингиты являются частой патологией в структуре нейроинфекций, причем бактериальные менингиты являются наиболее распространенными (до 56%) и относятся к категории социально опасных заболеваний. Благодаря наличию вакцин против менингококкового менингита серогрупп А, С, Y, W135 на основе их капсульных полисахаридов и созданию белковой поликомпонентной моновакцины серогруппы **В** стала возможной профилактика менингококковой инфекции основных эпидемически опасных серогрупп. Однако все используемые в настоящее время вакцины имеют узкую направленность против конкретного возбудителя инфекции.

Можно ли создать поливакцину эффективную против всех менингококков *Nisseria meningitidis*?

Одним из основных факторов вирулентности многих патогенов, проникающих через слизистые оболочки, является **IgA1 протеаза**. Это высокоспецифическая протеаза, расщепляющая IgA1 в шарнирной области.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ IGA ПРОТЕАЗ



IgA1 протеазы способствуют колонизации бактериями слизистой оболочки и проникновению их во внутреннюю среду организма вследствие расщепления этими ферментами секреторных иммуноглобулинов А1 человека, которые являются первым барьером защиты от инфекции. Следовательно, блокирование IgA1 протеаз на этой стадии инвазии должно являться препятствием развития инфекции, затрудняя адгезию бактерий на поверхности слизистой оболочки.

Вакцинации IgA1 протеазой должна привести к образованию соответствующих антител, блокирующих ее действие.

Продукция IgA1 протеаз характерна не только для *N. meningitidis*, но и для ряда других распространенных бактериальных патогенов человека: *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *St. pneumoniae*, *St. sanguis*, *Bacteroides*.

Протективная активность мутантной IgA1 протеазы при заражении мышей менингококками серогрупп А, В и С

