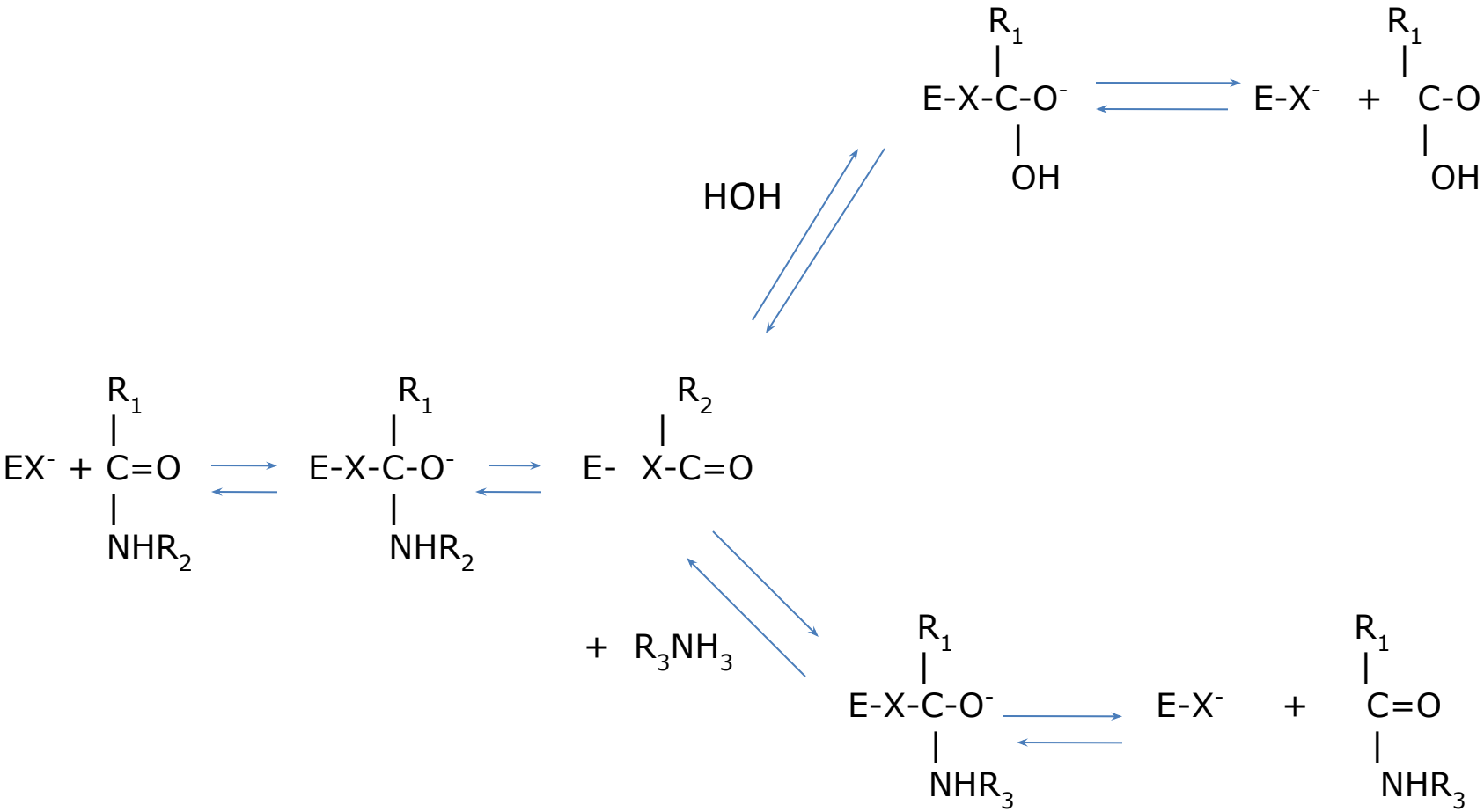
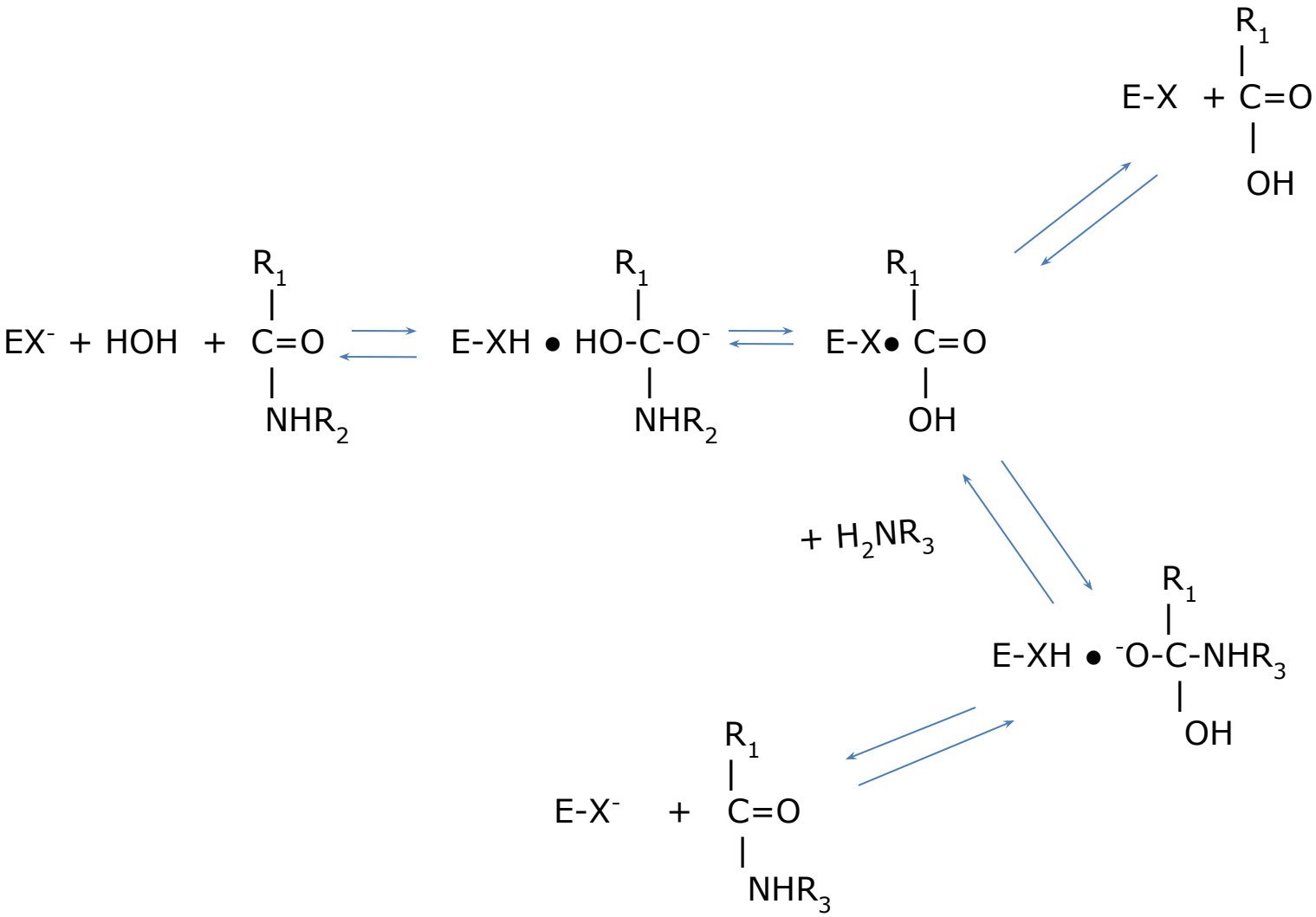
Ферменты в биотехнологии

НУКЛЕОФИЛЬНЫЙ КАТАЛИЗ



ОБЩИЙ ОСНОВНОЙ КАТАЛИЗ



Гидролиз химерных белков

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

вставка

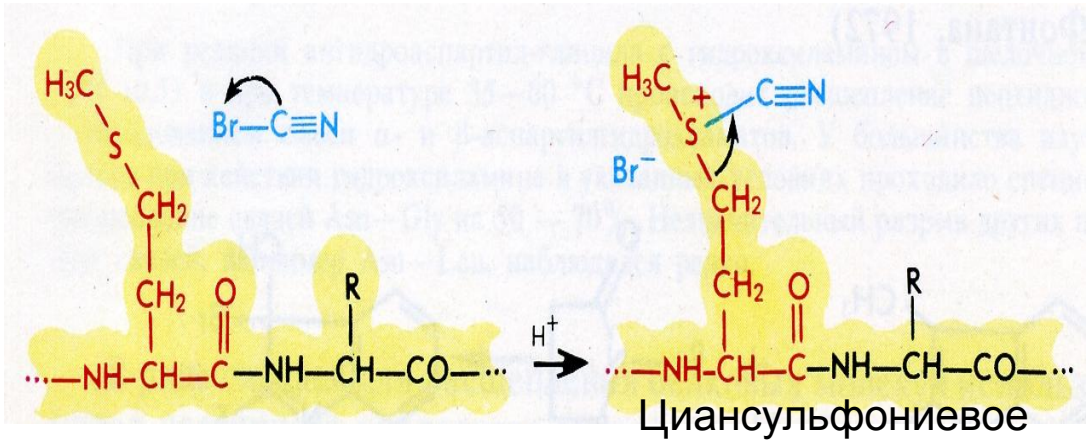
H_2N_____[--------]_____COOH

белок носитель целевой белок

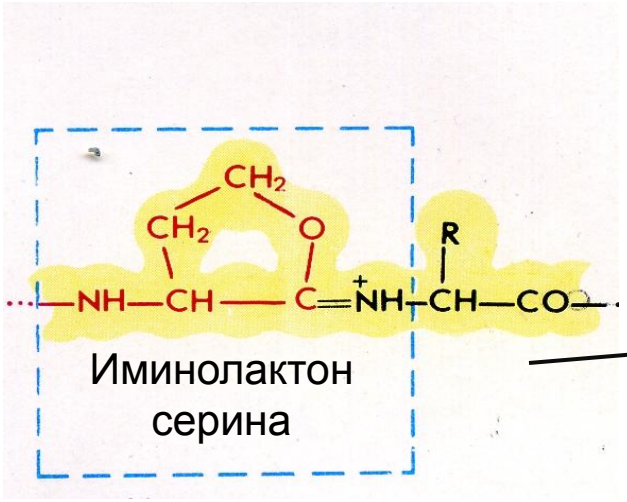
•*Химические методы*

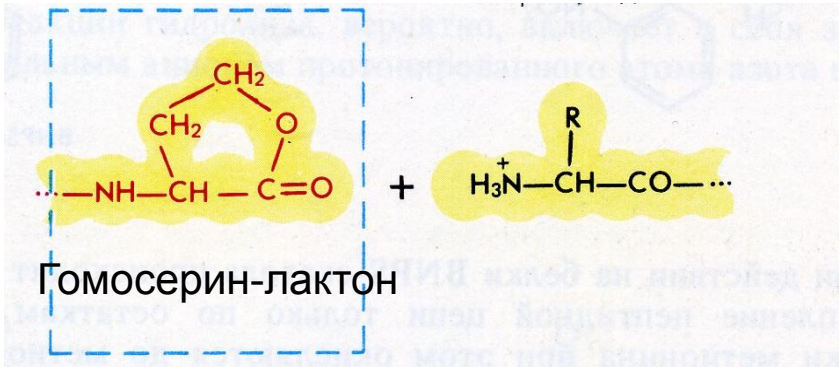
а) Расщепление BrCN после остатка Met.

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



$\xrightarrow{-\ H_3CSCN}$





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.

_____Asp-Pro_____ + HCOOH (водный раствор)

белок-носитель Вич1 протеаза

Pro_____COOH (Вич1 протеаза)

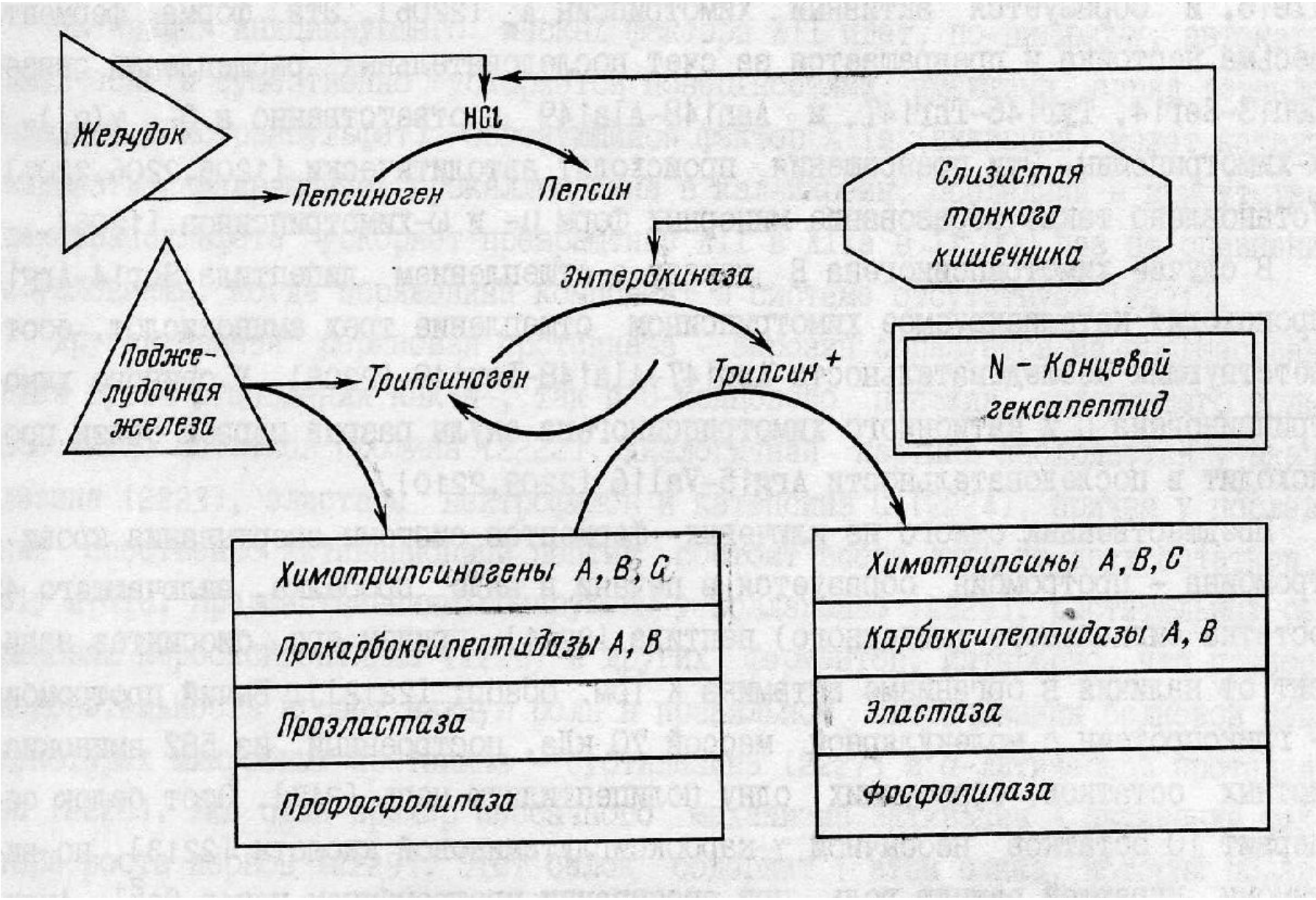
- **Ферментативное расщепление химерных белков**

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).

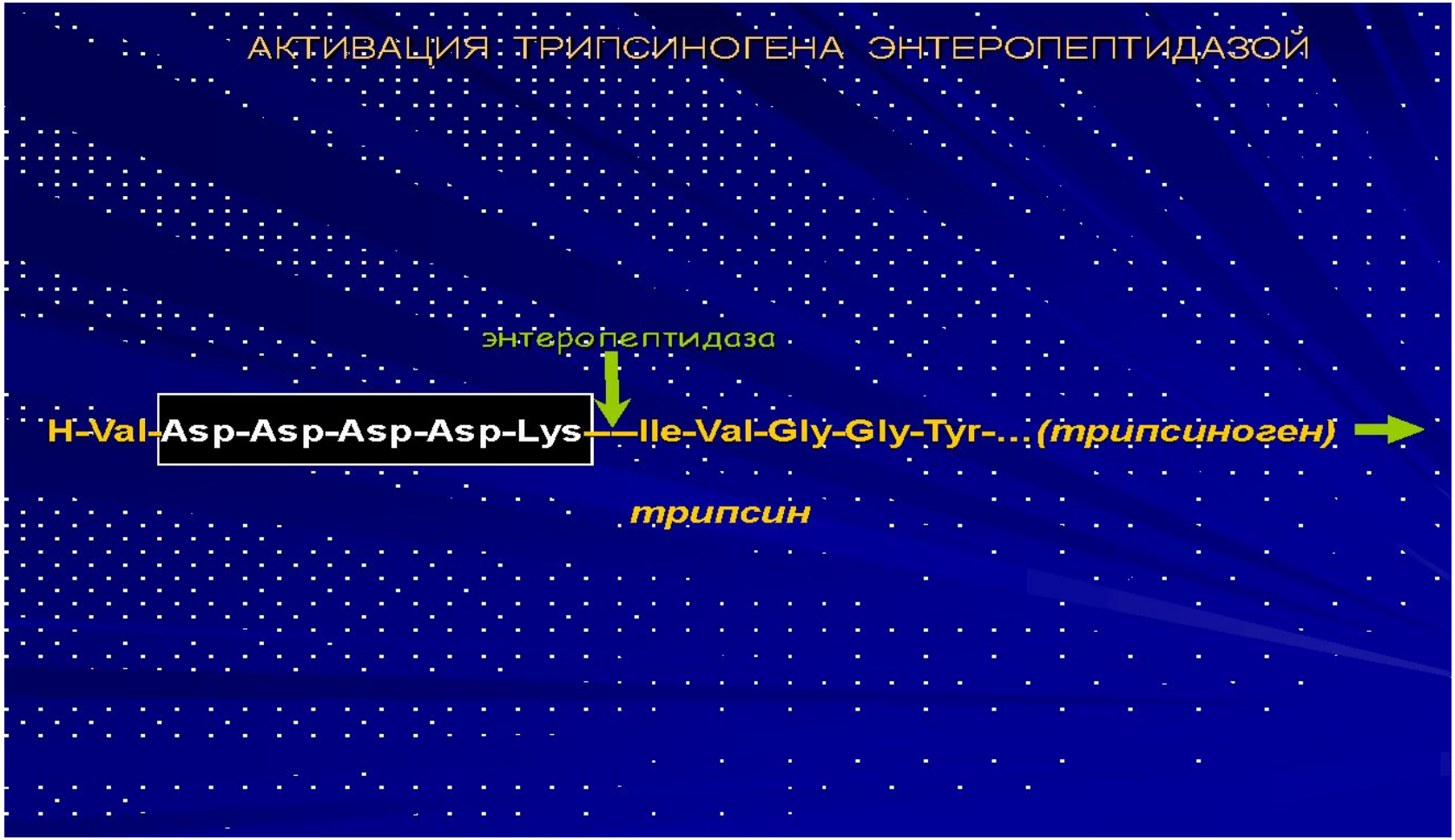
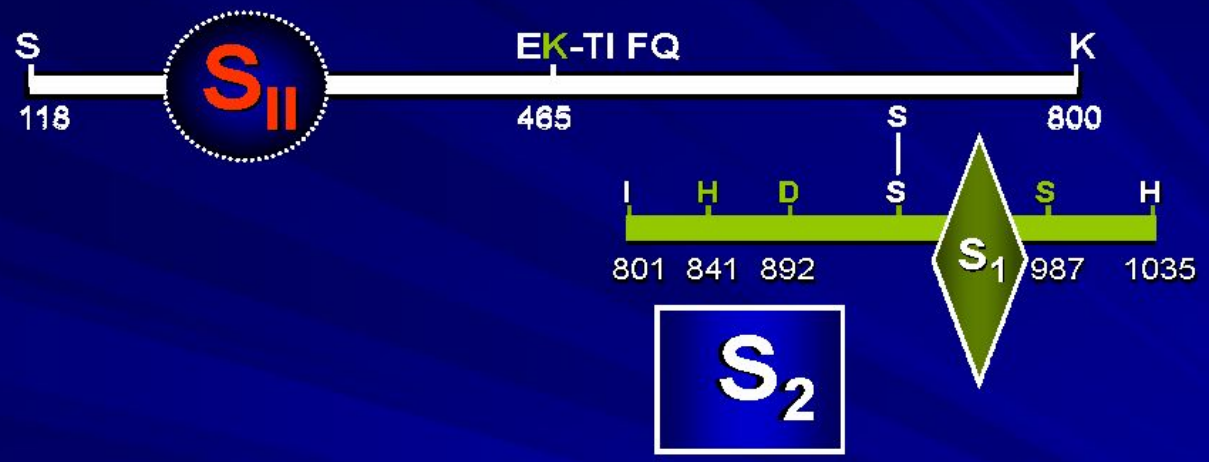


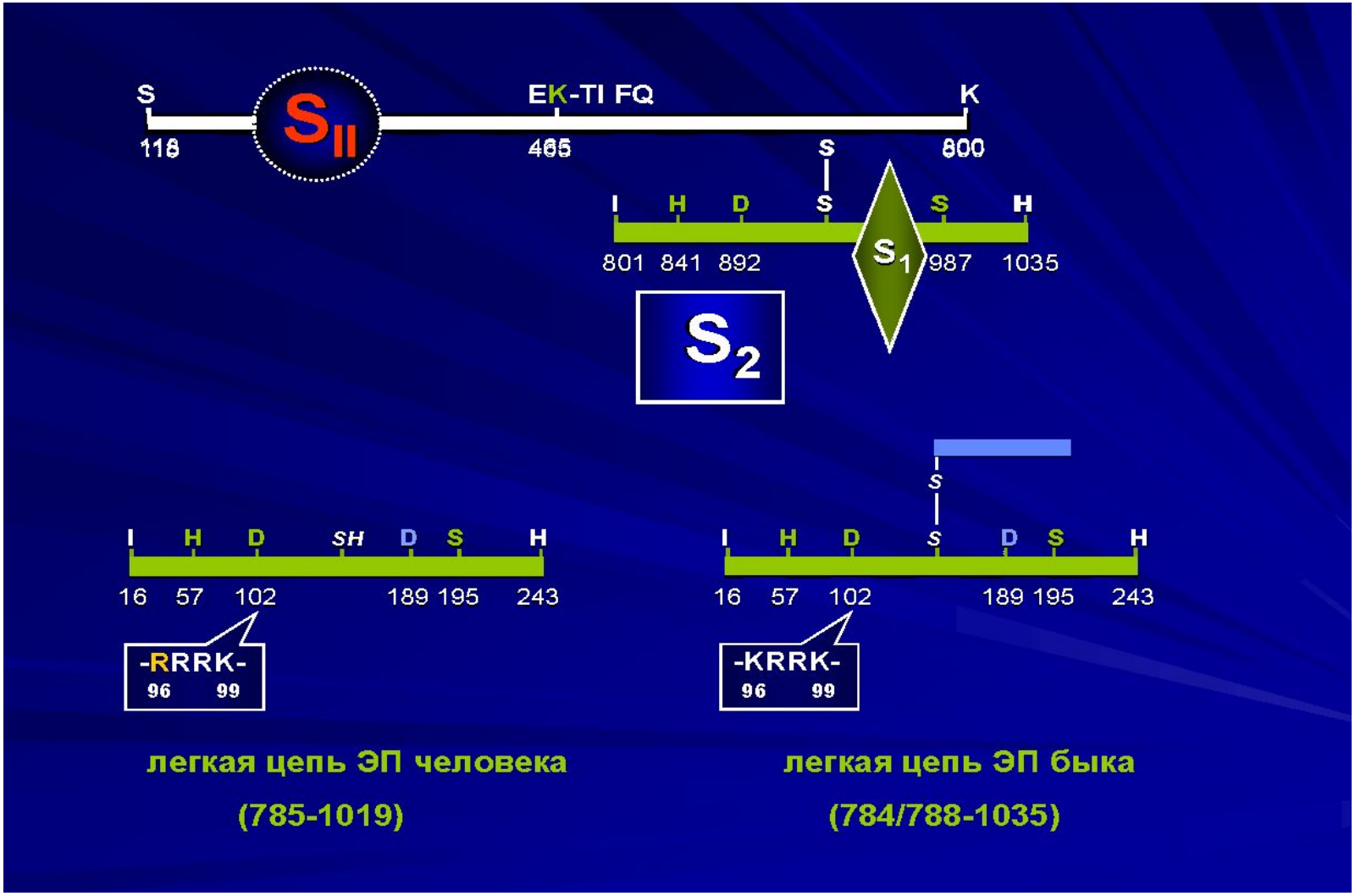
СХЕМА СТРОЕНИЯ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ (*КФ 3.4.21.9*)



Субстрат-связывающие центры
легкой цепи энтеропептидазы

S_5		S_4		S_3		S_2		S_1
-Lys^{886}	–	Arg^{887}	–	Arg^{888}	–	Lys^{889}	- -	Asp^{981}-
-Asp	-	Asp	-	Asp	-	Asp	-	Lys- ↓
P_5		P_4		P_3		P_2		P_1

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



Легкая цепь используется для гидролиза химерных белков.

H_2N_____(**Asp**)$_4$**-Lys**-_____COOH

белок носитель целевой белок

ЭП →

H_2N_____COOH

целевой белок

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 –

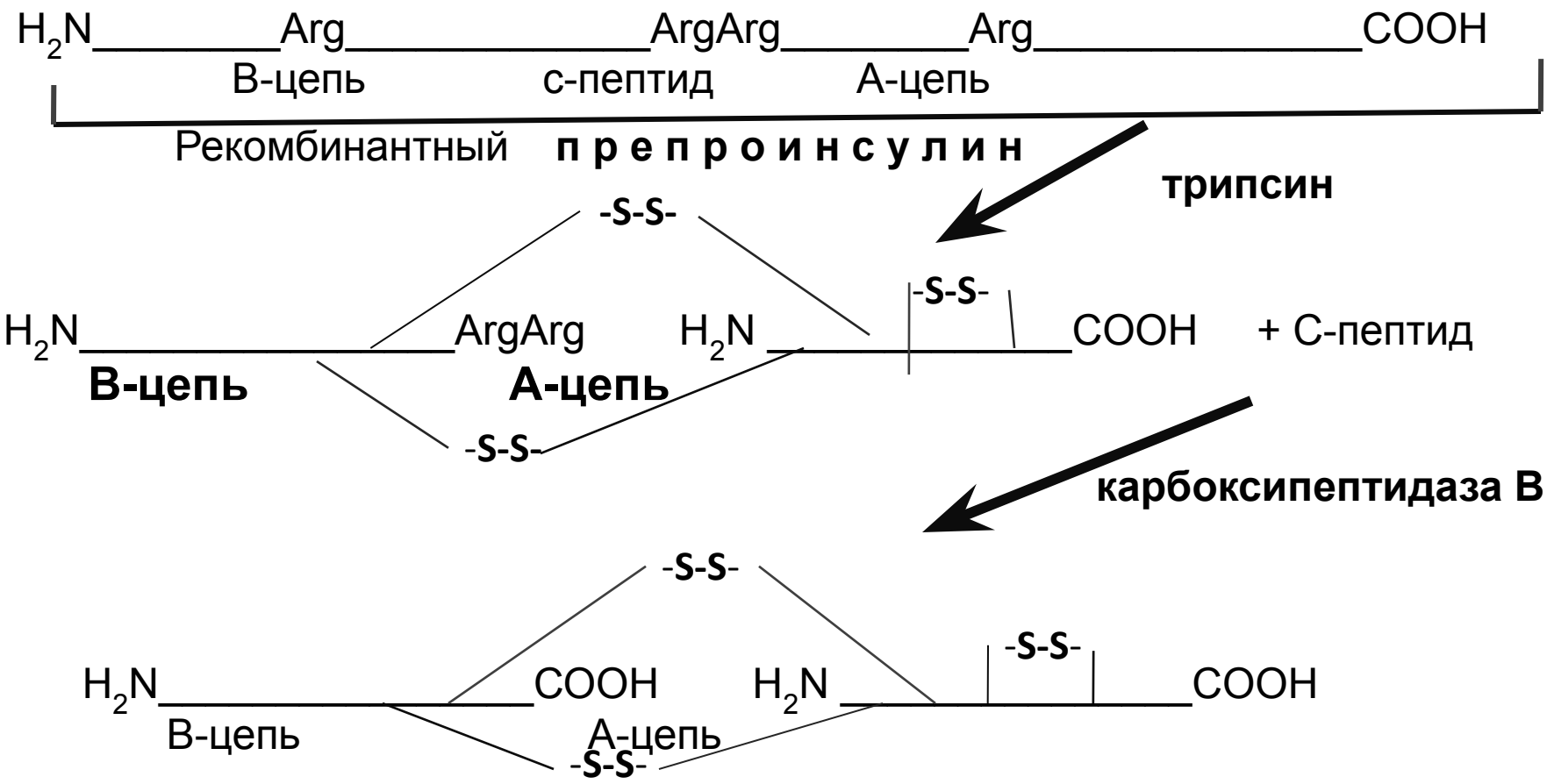
Glu-Val-Arg-Gly-Pro-Arg-

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-NH_2 - дерморфин А;

Глюкагон ---------Thr-NH_2 - 29 ак, гормон поджелудочной железы, связан с обменом углеводов;

Гастрин --------Phe-NH_2 - 17 ак. связан с секрецией желудком соляной кислоты;

Холецистокинин-панкреозимин –Phe-NH_2 - 33 ак. связан с секрецией пищеварительных ферментов;

Секретин --------Val-NH_2 27 ак. связан с деятель-ностью желудочно-кишечного тракта.;

Кальцитонин ------Pro-NH_2 32 ак.

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

Кальцитонин применяют при лечении различных системных заболеваний, таках 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?

----------**X**-C(O)—**NH-CH$_2$-C(O)**—LysArg----------

целевой полипептид *глицин*

трипсиноподобный фермент

----------**X**-C(O)—**NH-CH$_2$-C(O)**—LysArg-COOH

карбоксипептидаза В

----------**X**-C(O)—**NH-CH$_2$-COOH**

пептидил-глицин альфа-амидирующая монооксигенгаза

----------**X**-C(O)—**NH-CH(OH)** -COOH

----------**X-C(O)-NH$_2$** + CH(O)-COOH

амид *целевого полипептида* *глиоксиловая кислота*

Амидирование с помощью реакции транспептидации

в присутствии карбоксипептидазой **Y** (КПY).
КРY - сериновая протеаза с широкой специфичностью и широким диапазоном pH

NH_2 ~~Pro-C(O)~~--NHLeuCOOH + **OH-CH_2-Ser**---КПY

рекомбинантный Leu - кальцитонин Ser активного центра

NH_2 —— Pro-C(O)--**O-CH_2-Ser**---КПY

ацилфермент

NH_4OH, pH 9,5

NH_2 —— **Pro-C(O)NH_2**

кальцитонин
(выход до 30%)

H_2O

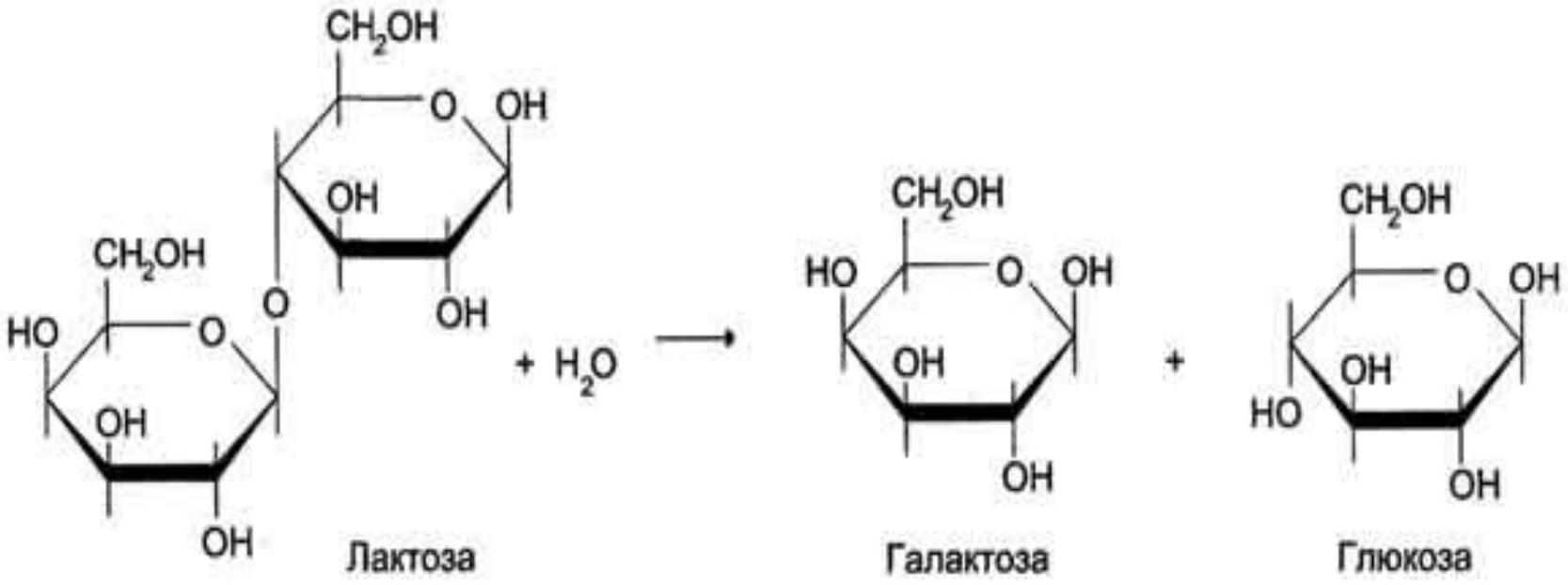
NH_2 —— ProCOOH

дезамидокальцитонин

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



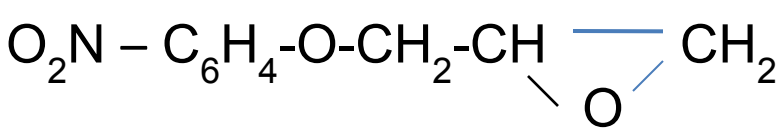
МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ

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

$$\overset{-}{N}=\overset{+}{N}=CHCO-NHCH(CH_2)_3CH_3-COOCH_3$$

метиловый эфир диазоацетилнорлейцин



1,2-эпокси-3-(*p*-нитрофенокси)-пропан

казеин

КАЗЕИН (от лат. caseus - сыр), основная. белковая фракция молока; относится к запасным белкам. Представляет собой смесь α-, β-, к- 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.

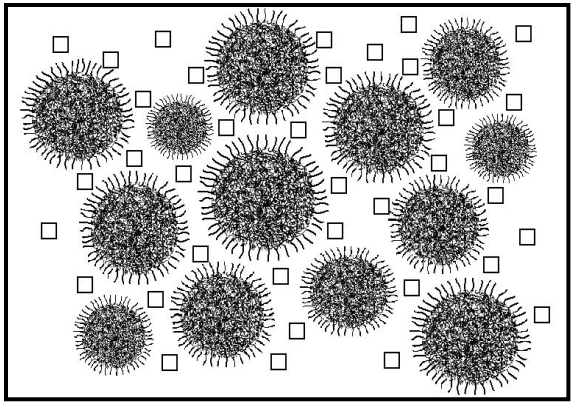
ХИМОЗИН

NH_2_____Phe(105)____Met(106)_____COOH ⟹

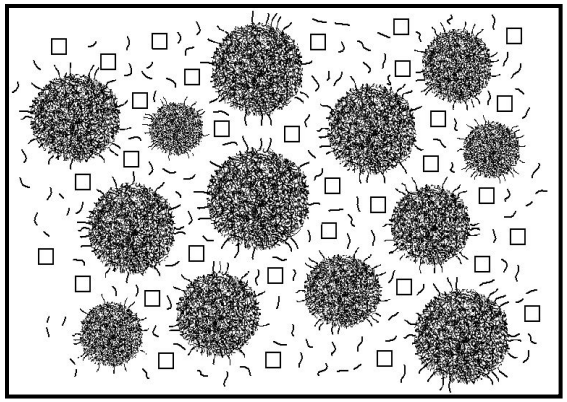
(к- казеин)

NH_2_____PheCOOH + NH_2 Met(106)_____COOH

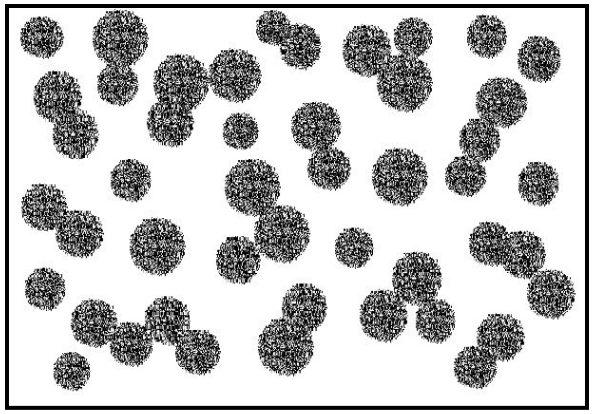
(пара- к-казеин) (гликомакропептид 63 ак)



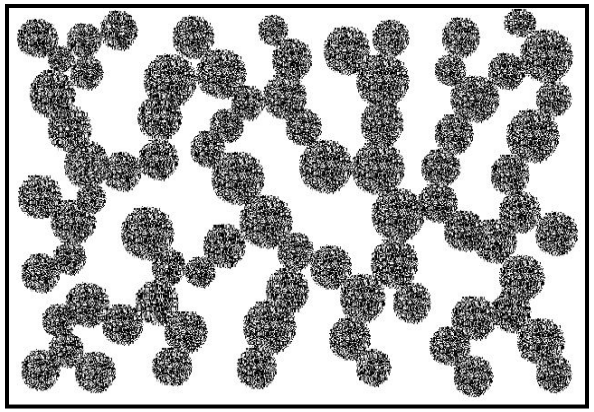
А



Б



В



Г

А – стадия внесения молокосвертывающего фермента (□); 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

$$R_1\text{-}COOH + NH_2R_2 \xrightleftharpoons{H_2O} R_1CO\text{—}NHR_2$$

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 аспапртама (Asp-PheOMe)

$$BocAspCOOH + H_2NPheOMe \xrightarrow{\text{термолизин}} BocAspPheOMe$$

$$BocAspPheOMe \rightarrow \textbf{AspPheOMe}$$ **выход 95%**

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

Ингибиторы ферментов – лекарственные препеараты

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

Plm II

-A^{26}EALERMF--LSFP^{37}-

Специфическая инактивация плзмепсина 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 - $HN\text{-}CH(CH_2CH(CH_3)_2)CH(OH)CH_2COOH$

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, 37^0C

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:

X -HN-CH-CO-

|

CH_2-O-$(CH_2)_2$ -CH_2-OH

Y – $(CH_3)_2$CH-CH(OH)-CO-

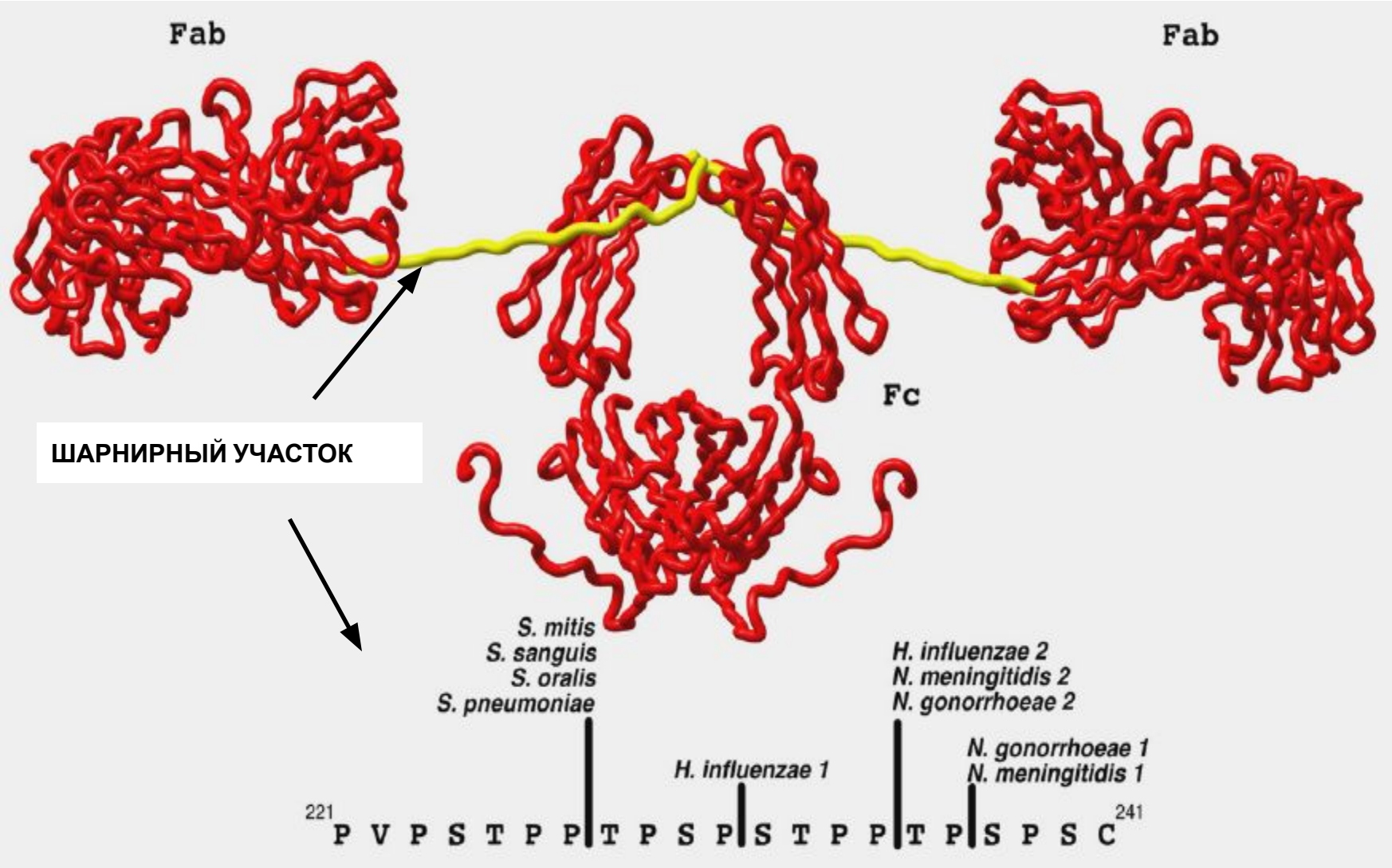
Менингит

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 A, C, Y, W135 на основе их капсульных полисахаридов и созданию белковой поликомпонентной моновакцины серогруппы **B** стала возможной профилактика менингококковой инфекции основных эпидемически опасных серогрупп. Однако все используемые в настоящее время вакцины имею узкую направленность против конкретного возбудителя инфекции.

Можно ли создать поливапкцину эффективную против всех менингококков Nesseria meningitidis?

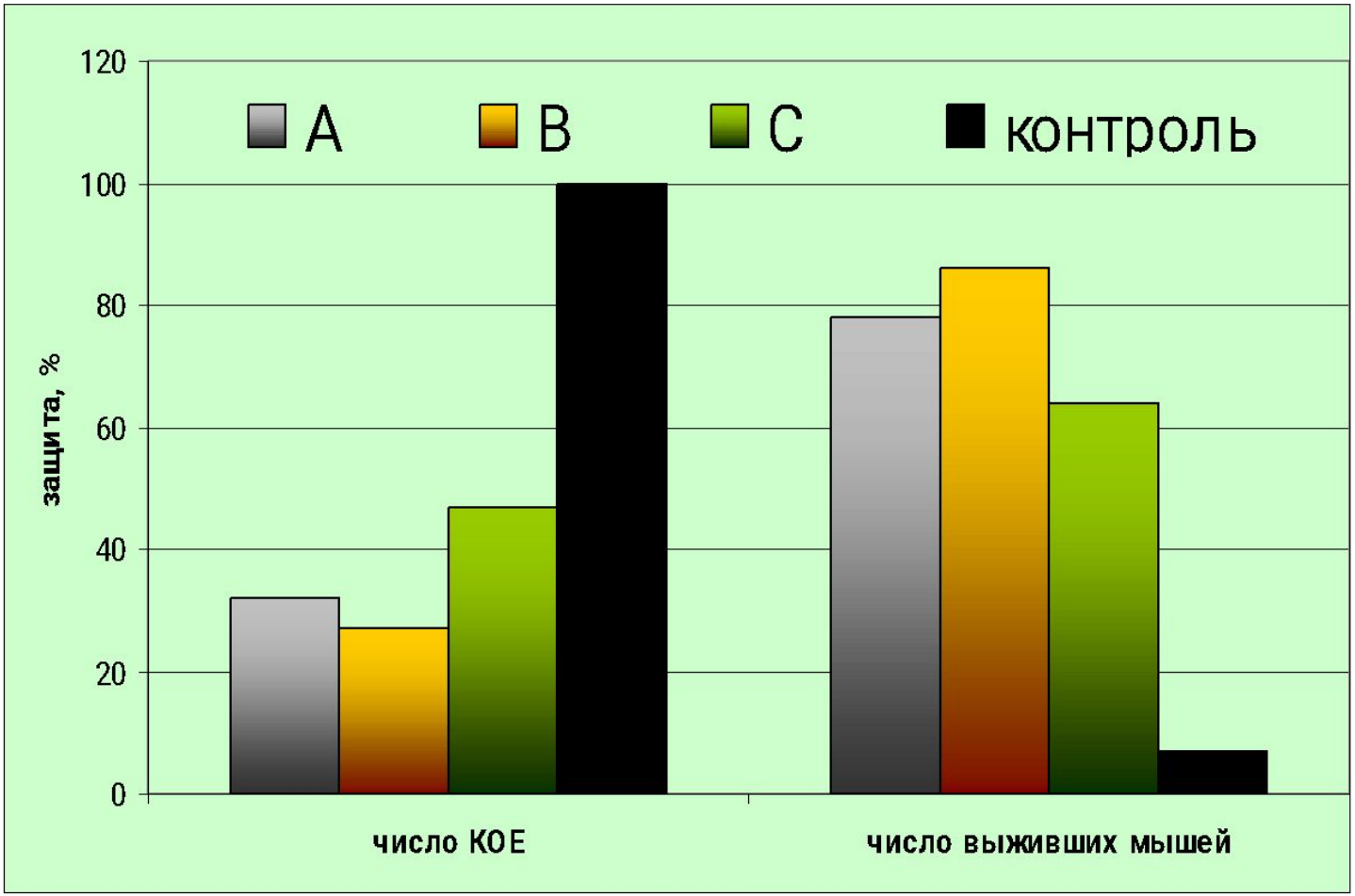
Одним из основных факторов вирулентности многих патогенов, проникающих через слизистые оболочки, является **IgA1 протеаза**. Это ысокоспецифическая протеазы, расщепляющая IgA1 в шарнирной области.

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 A, B и C