

ФЕРМЕНТЫ КАК ВАЖНЫЙ ЭЛЕМЕНТ ЖИВЫХ СИСТЕМ И ОБЪЕКТ НАНОТЕХНОЛОГИЙ

Н.Л.Клячко

Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова

Научно-образовательный центр по нанотехнологиям МГУ

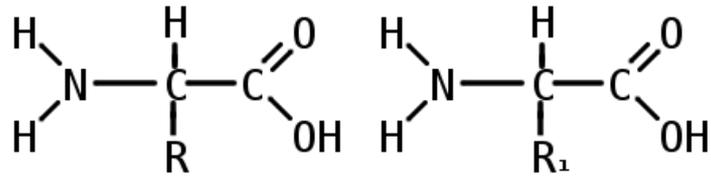
ФЕРМЕНТ = ENZYME («ЭНЗИМ»)

Спор Пастера с Бертло и Либихом (19 век)
О природе спиртового брожения

Ферментами от латинского *Fermentum* (закваска) называли сами микроорганизмы (то есть целые клетки).

Слово энзим от греческого *En* (в) и *zyme* (закваска) было предложено Кюне в 1876 г. для, так называемых, неорганизованных ферментов, секретлируемых клетками, например, в желудок.

Бюхнер в 1897 г. экспериментально доказал, что и бесклеточный дрожжевой сок осуществляет спиртовое брожение так же хорошо, как и неразрушенные клетки микроорганизмов

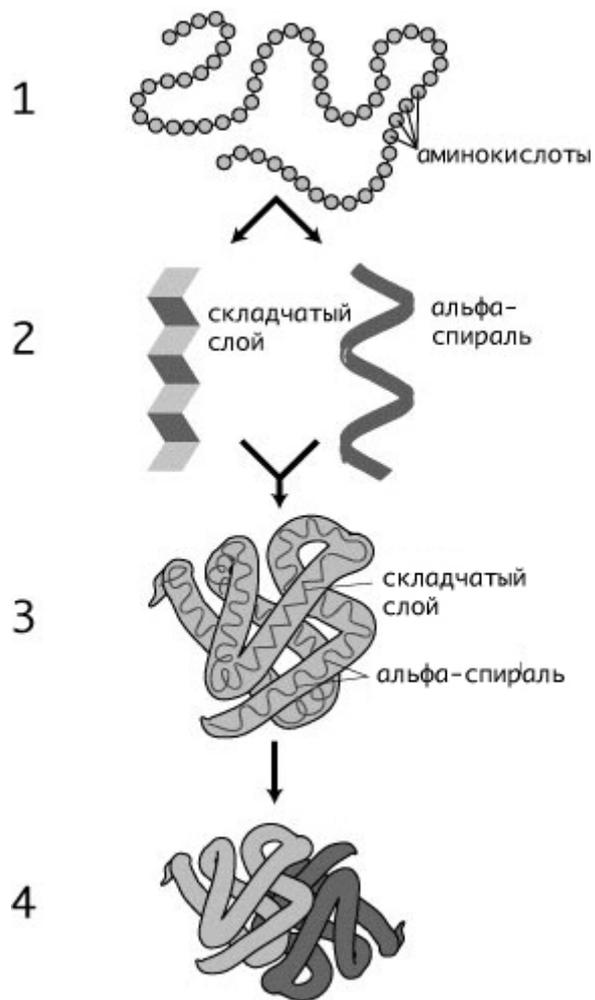


Ферменты - это молекулы белков, которые катализируют (ускоряют) протекающие в организме процессы.

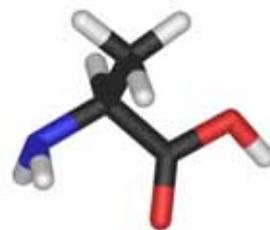
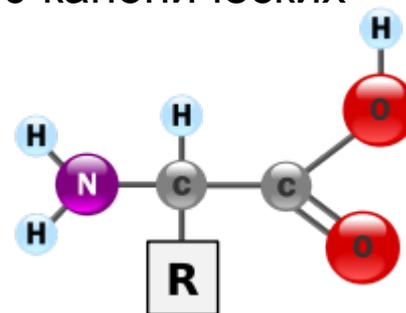
Практически любая реакция в организме осуществляется под действием катализатора. Простая реакция гидратации углекислого газа в организме идет под действием катализатора (фермента) - карбоангидразы:



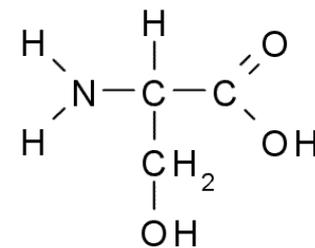
Уровни структуры белков: 1 — первичная, 2 — вторичная, 3 — третичная, 4 — четвертичная



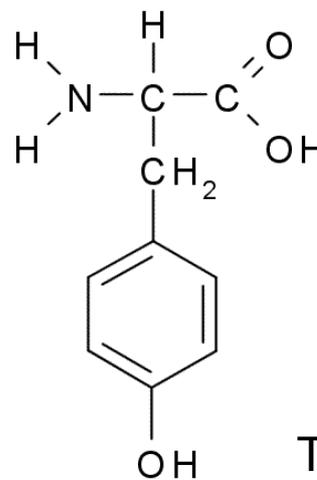
Аминокислота
20 канонических



Аланин



Серин

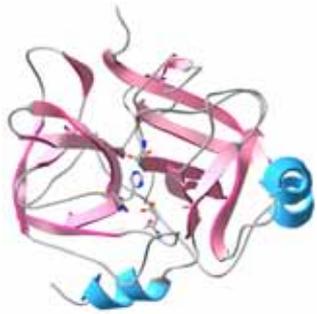


Тирозин

ФЕРМЕНТЫ (enzymes, «энзимы») – белки с особой функцией катализа

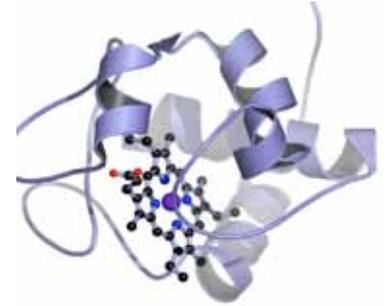
БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

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)

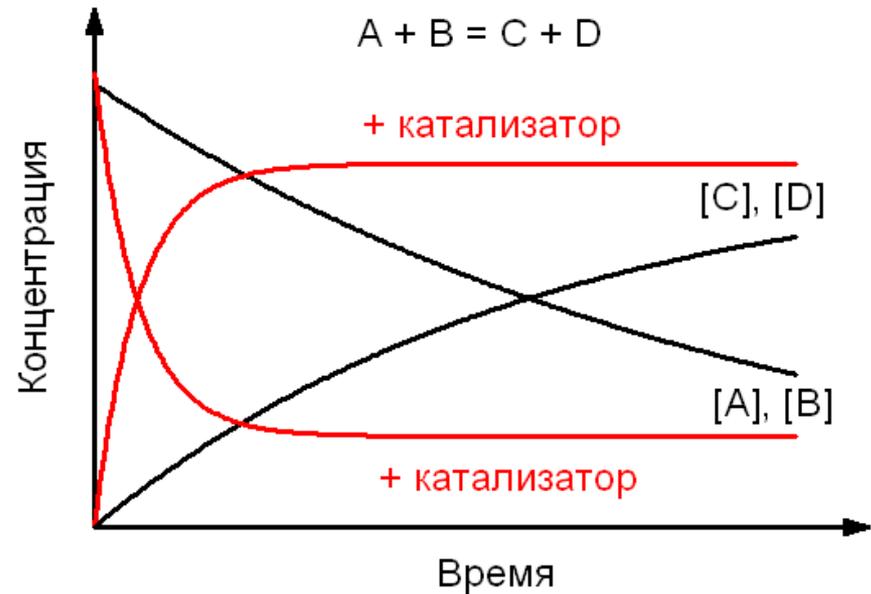
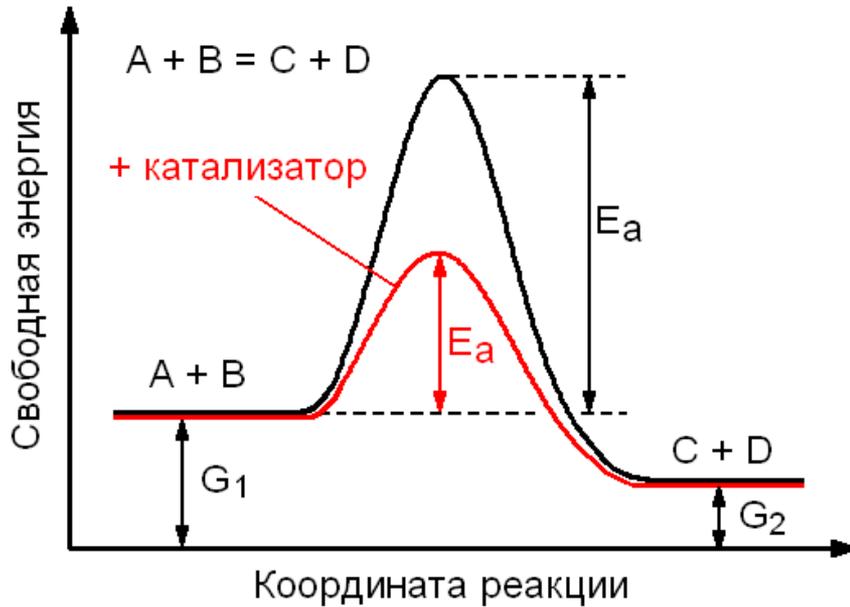
Белки содержат липиды (**липопротеины**: протеинкиназа А)

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

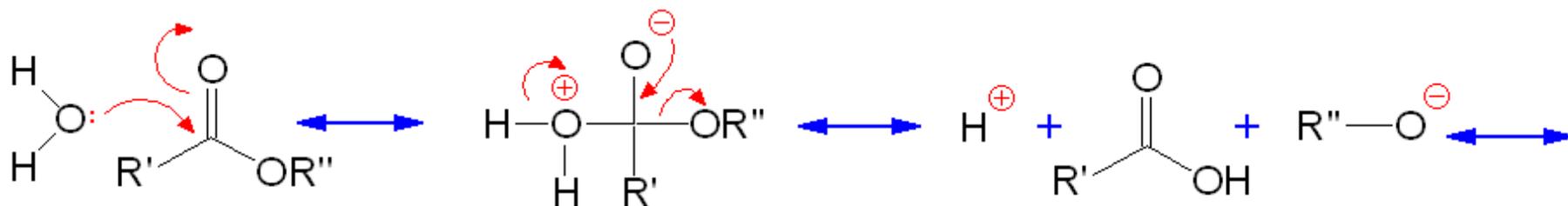
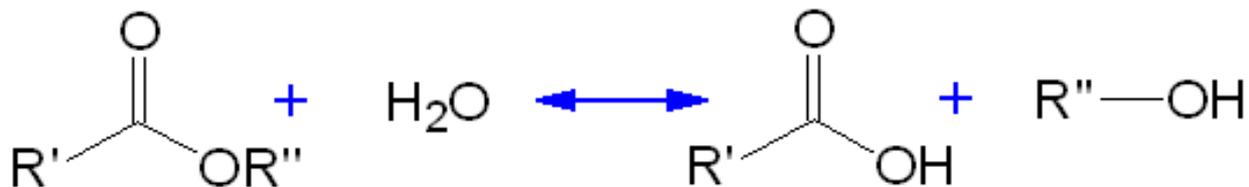
ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ КАТАЛИЗА



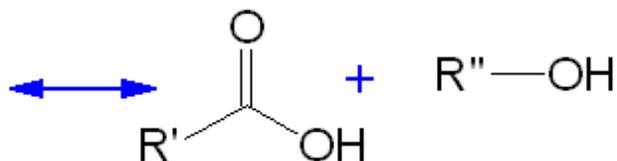
- Не всякая термодинамически выгодная химическая реакция будет идти (энергия активации, переходное состояние)
- Катализатор не влияет на константу равновесия (не изменяет $\Delta G = G_2 - G_1$)
- Катализатор понижает энергию активации

ГИДРОЛИЗ СЛОЖНОГО ЭФИРА

В водной среде при нейтральных рН



Реакция нуклеофильного замещения



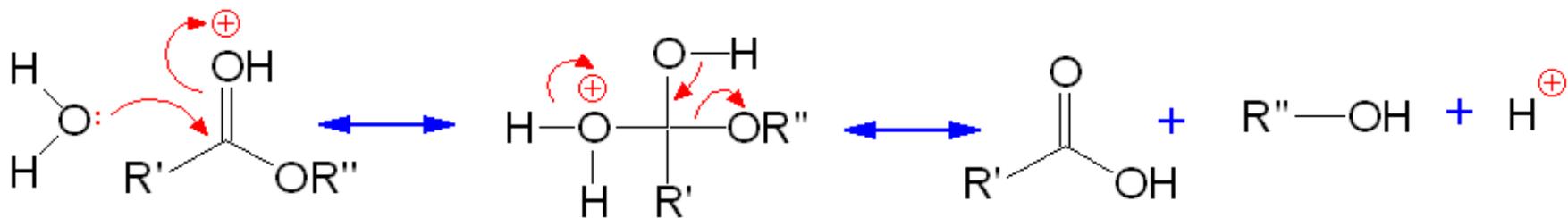
Переходное состояние двухзарядное (положительный и отрицательный заряды вблизи друг друга).

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

ОСНОВНЫЕ ТИПЫ КАТАЛИЗА

1. Кислотно-основной катализ (H^+ или OH^-)
2. Ковалентный катализ (электрофильный или нуклеофильный)
3. Внутримолекулярный катализ

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

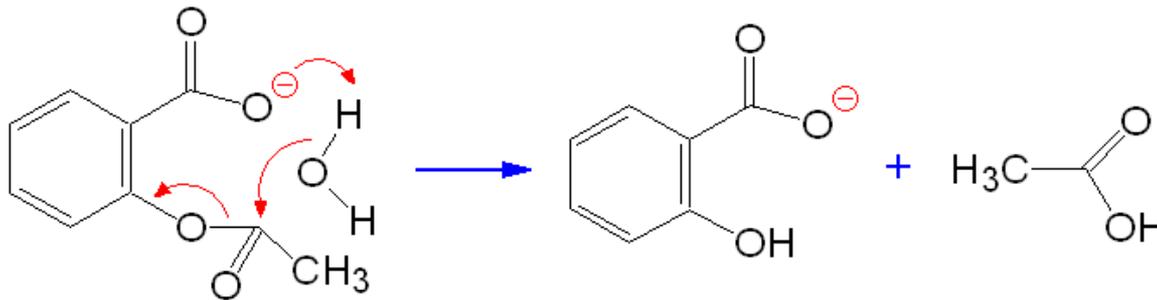


Протонированная форма эфира атакуется водой

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.



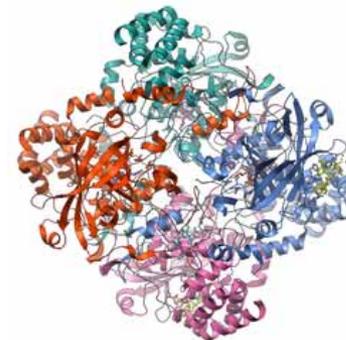
Энтропия – важный фактор катализа

Реакции в растворе \Rightarrow сближение реагирующих молекул \Rightarrow уменьшение энтропии

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

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

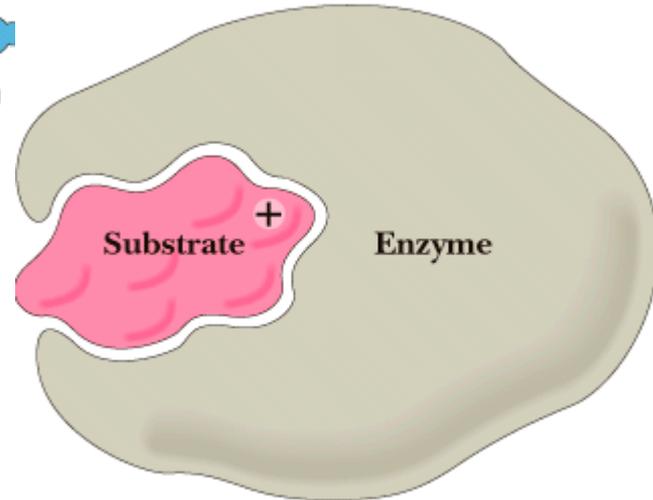
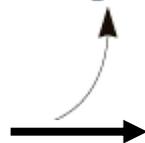
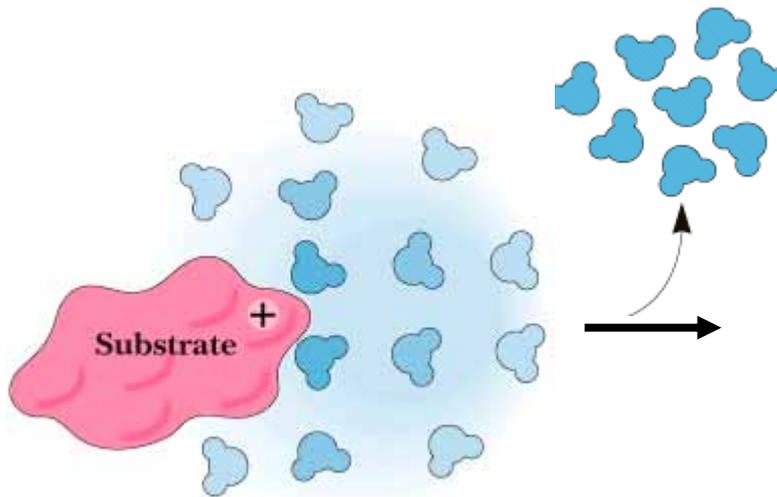
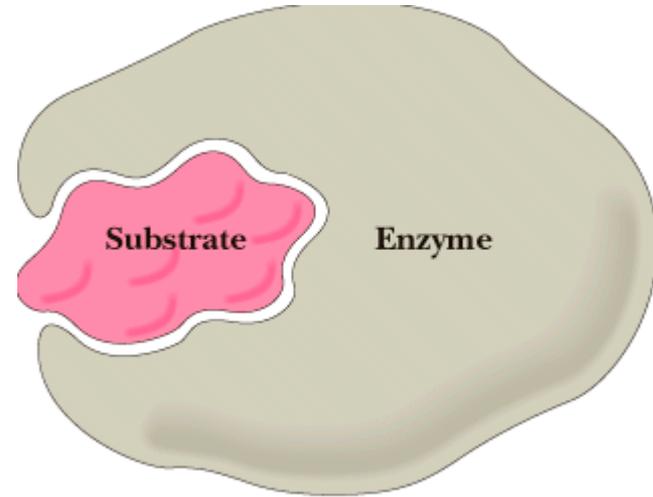
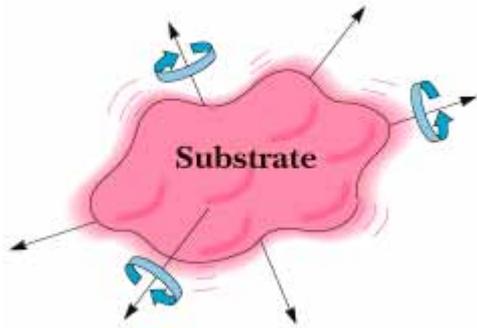
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ



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

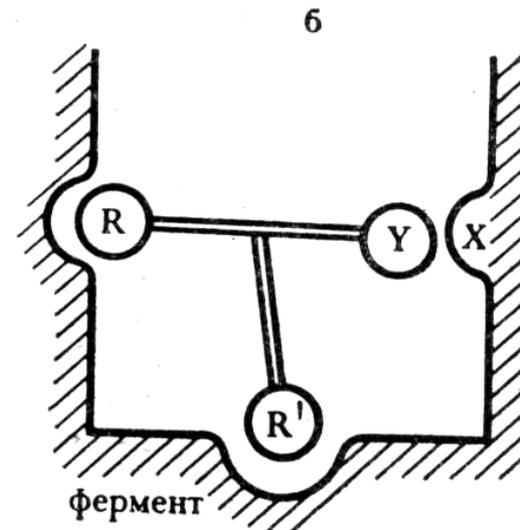
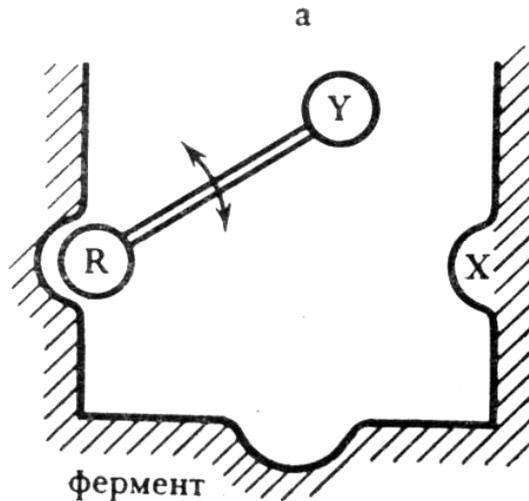
Эффективность ферментативного катализа

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

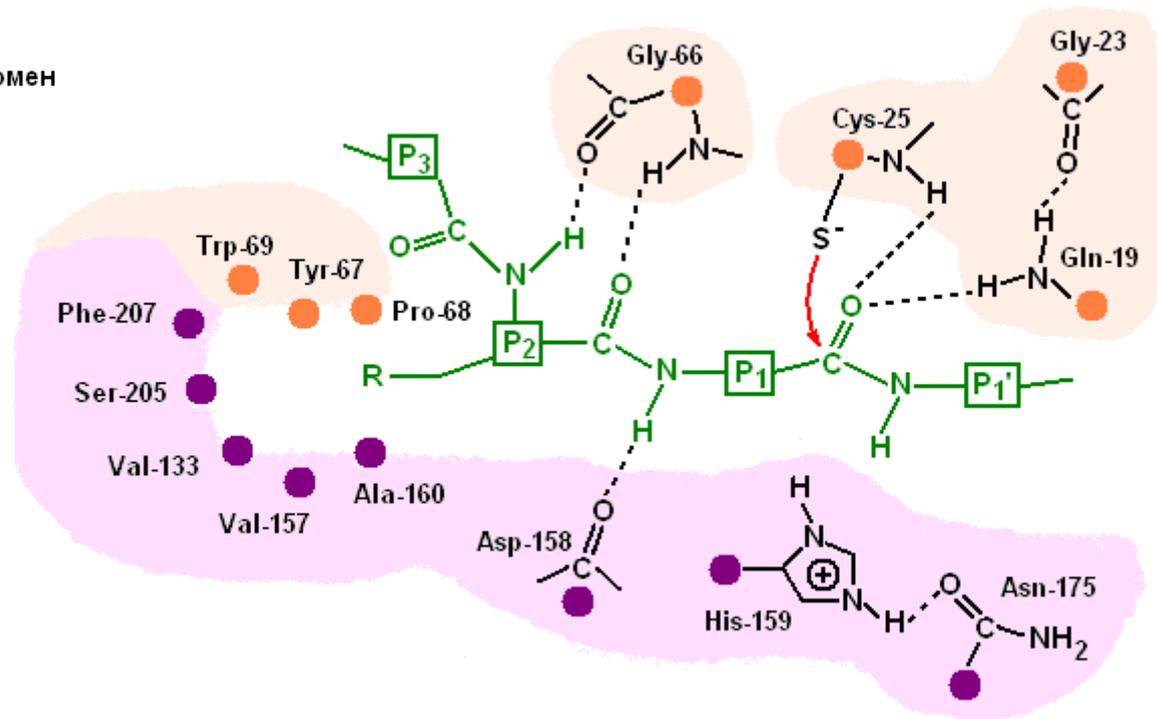
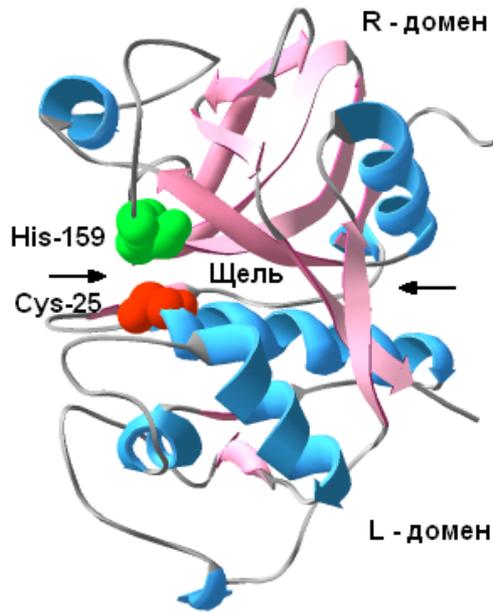
I - СБЛИЖЕНИЕ (КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ)

II - ОРИЕНТАЦИЯ

III - ЭФФЕКТЫ СРЕДЫ

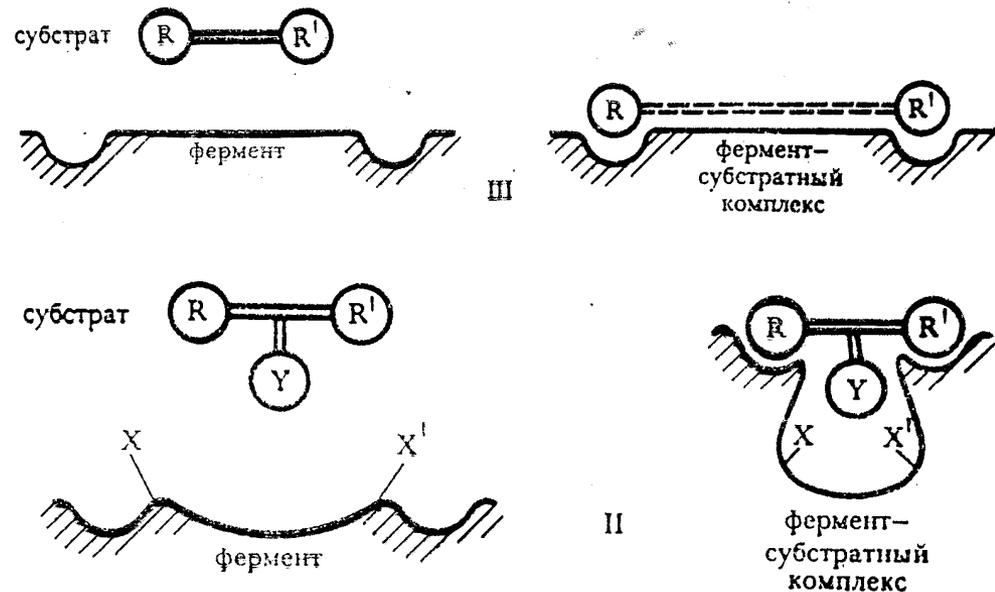
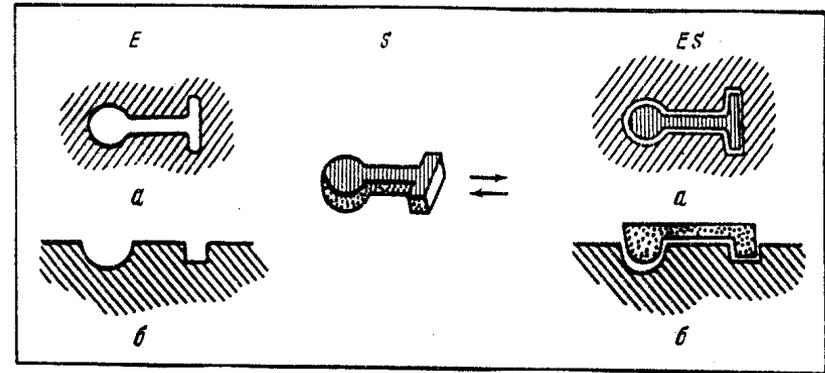


ПАПАИН: взаимодействие субстрата с активным центром фермента



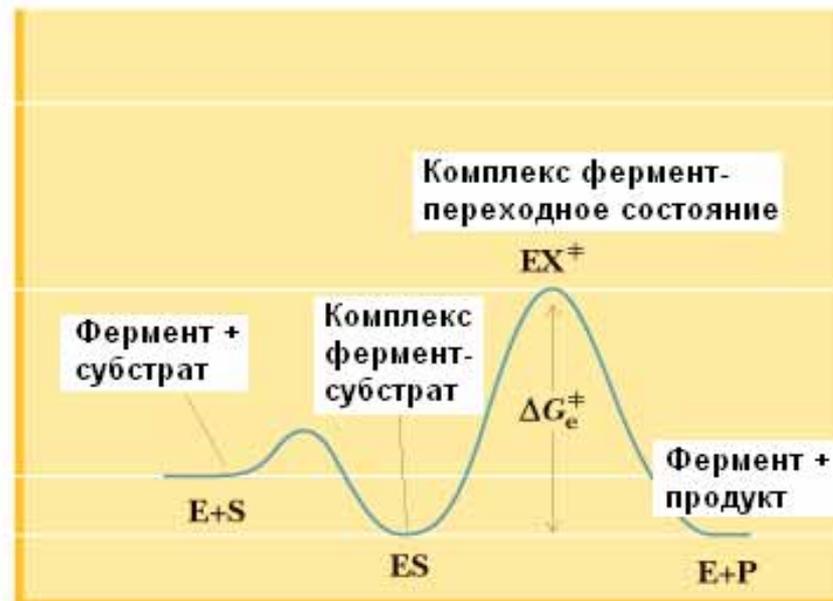
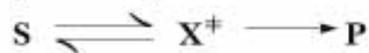
Теории ферментативного катализа

- Концепция «ключ-замок» (Э. Фишер)
- Теория напряжения (дыбы) (Р. Ламри, В. Дженкс).
- Теория индуцированного соответствия. (Д. Кошланд)

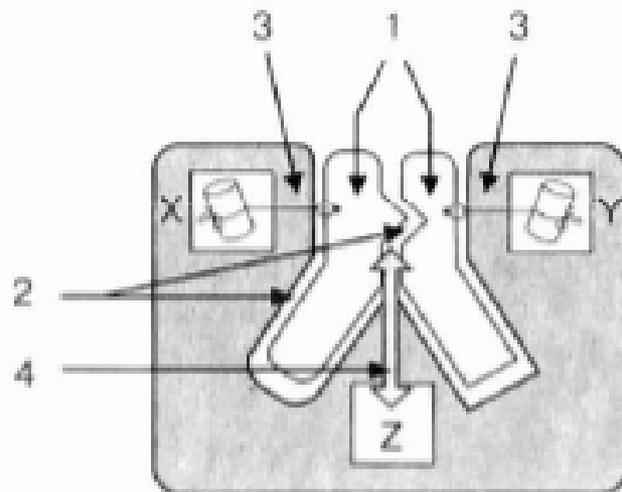




Координата реакции \longrightarrow

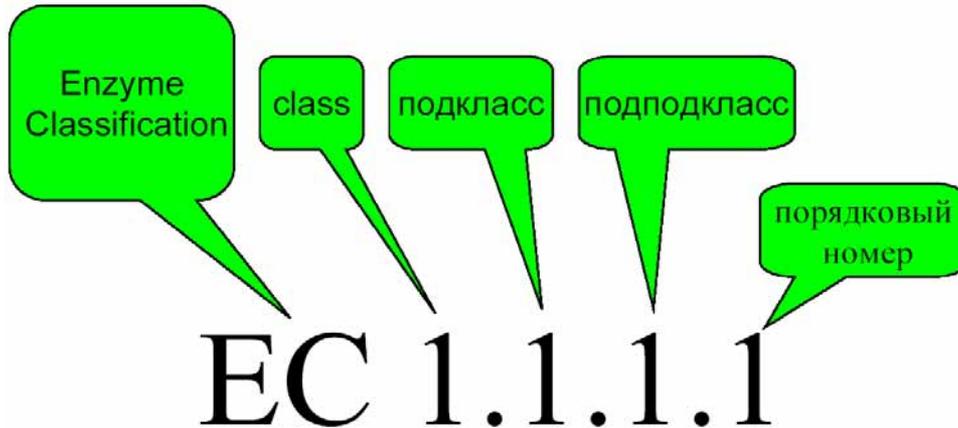


- 1 Сближение и ориентация субстратов
- 2 Исключение воды
- 3 Стабилизация переходного состояния
- 4 Перенос группы



В. Основы ферментативного катализа

Классификация ферментов – E.C. (Enzyme Classification)



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

РЕГУЛЯЦИЯ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

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

Ингибиторы обратимые

Конкурентные

Неконкурентные

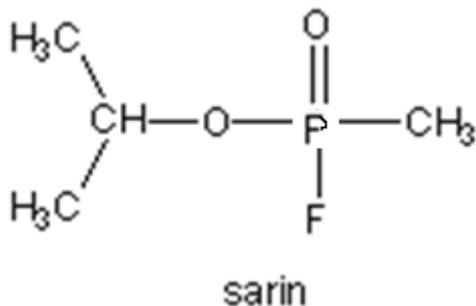
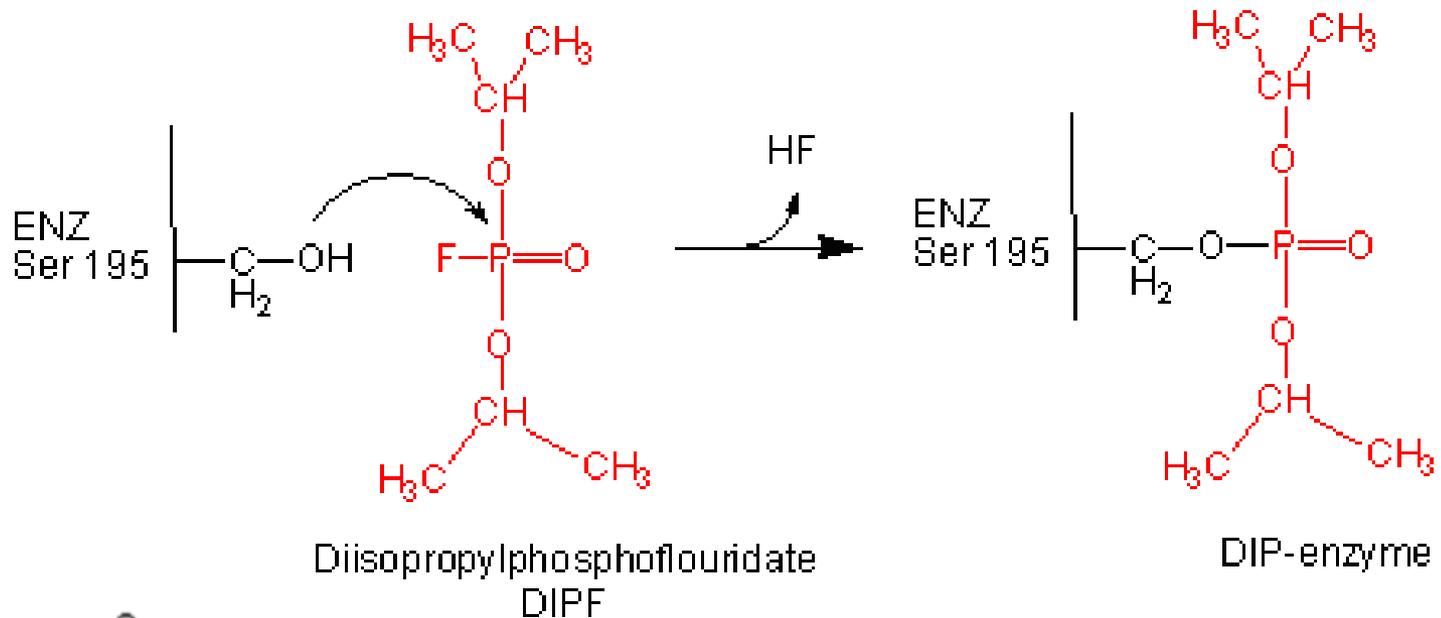
Бесконкурентные

Ингибиторы необратимые

Модификаторы

Субстратоподобные
(суицидные)

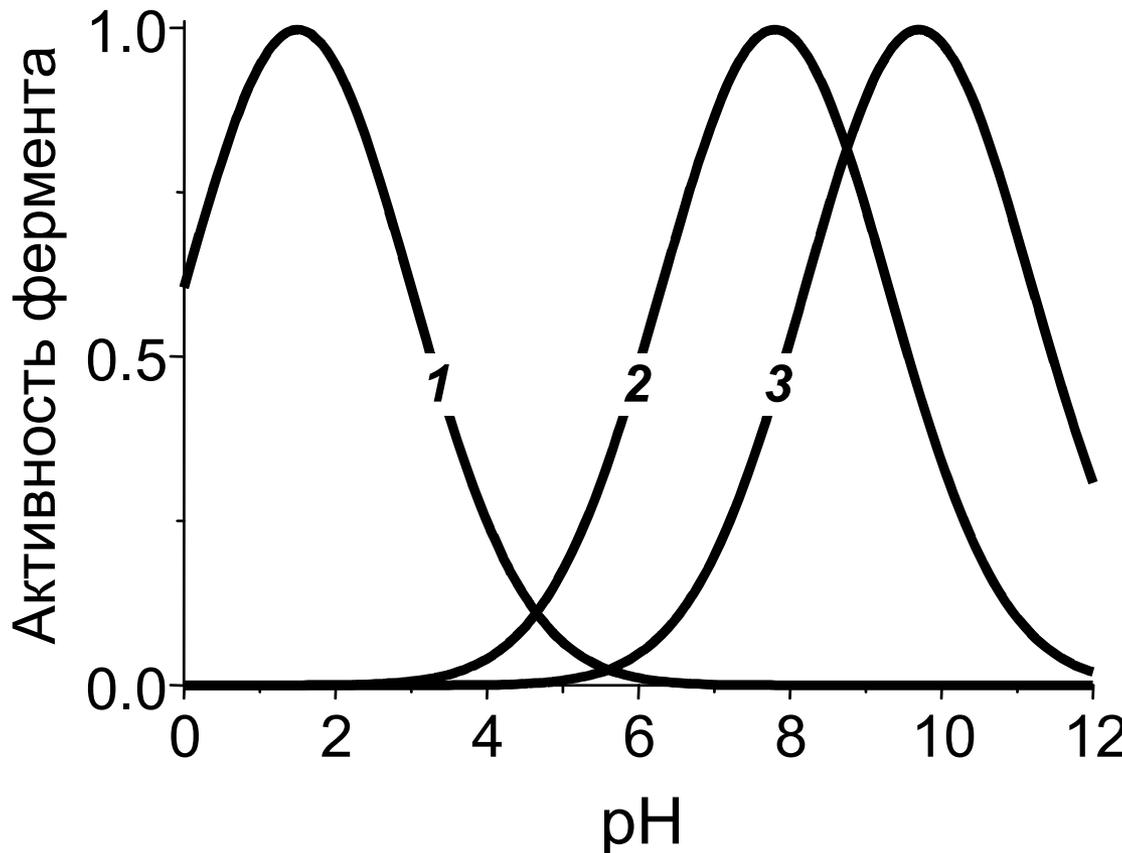
НЕОБРАТИМОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ СЕРИНОВЫХ ГИДРОЛАЗ



Фосфотриэстераза перерабатывает
фосфорорганические соединения

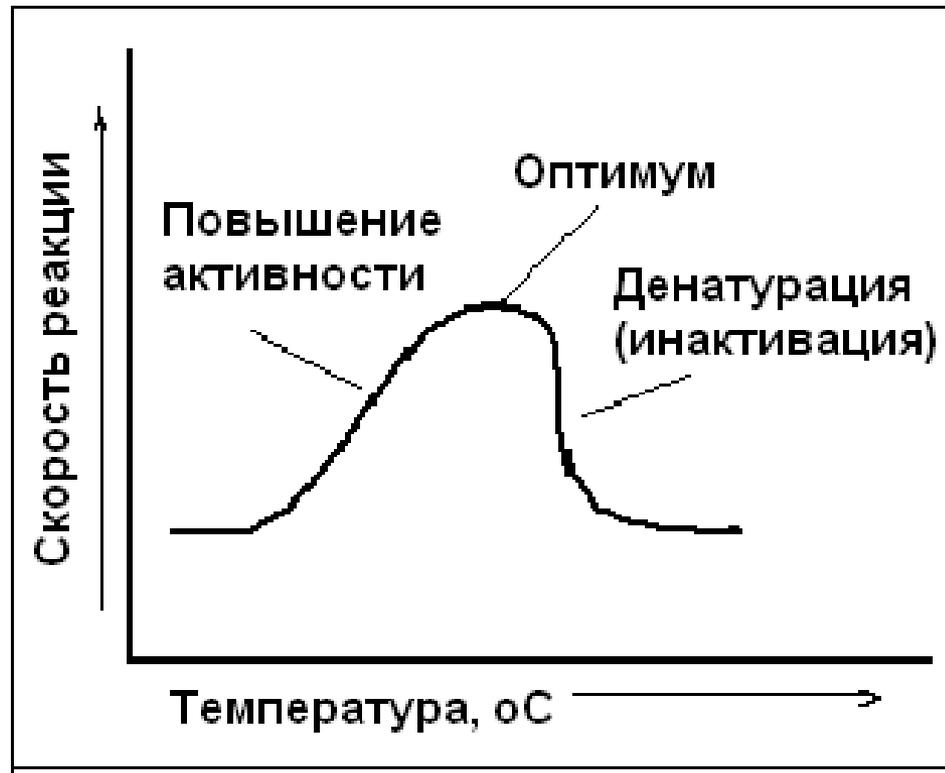
Кинетика ферментативных реакций

Зависимость скорости ферментативных реакций от pH

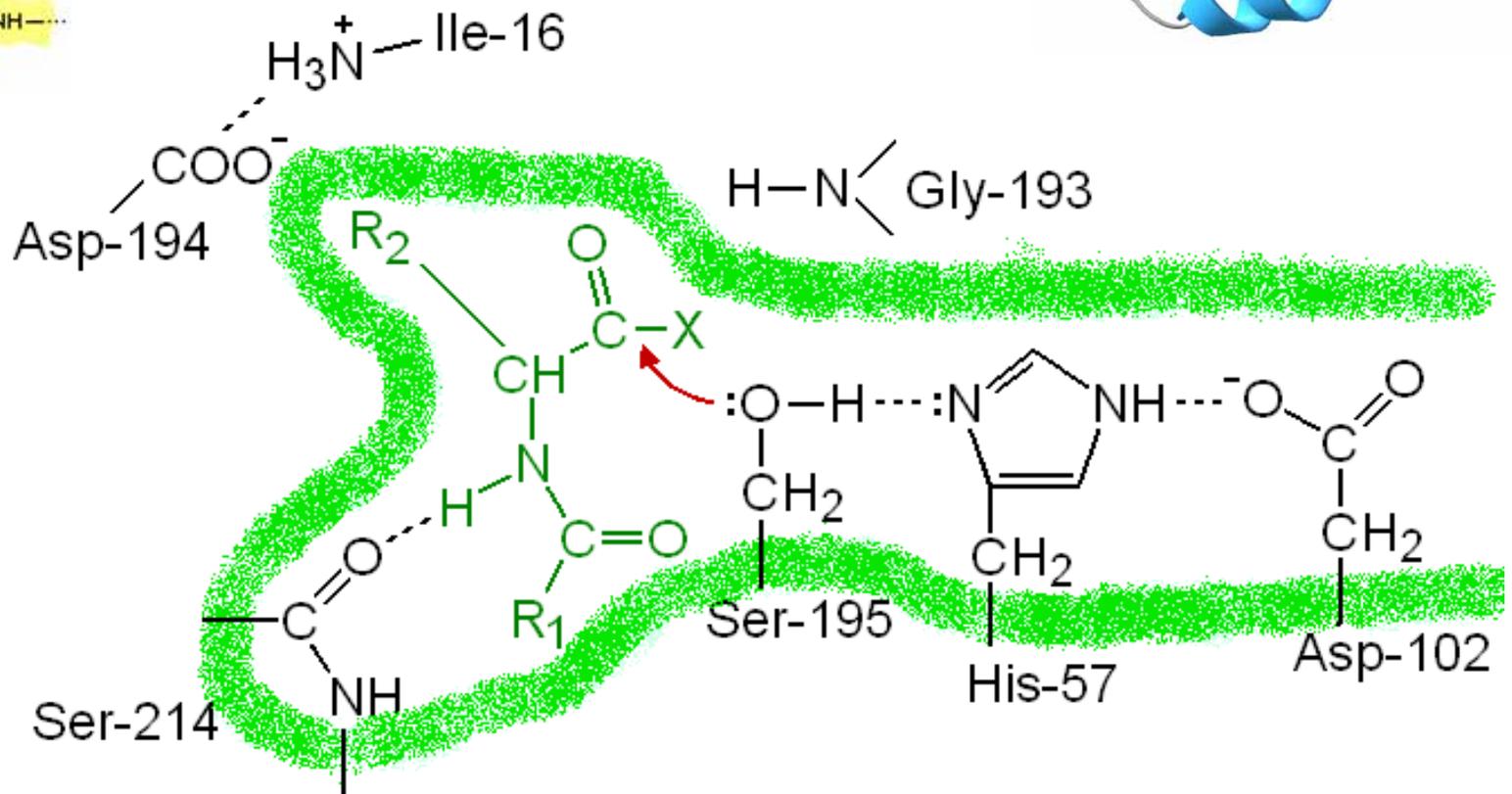
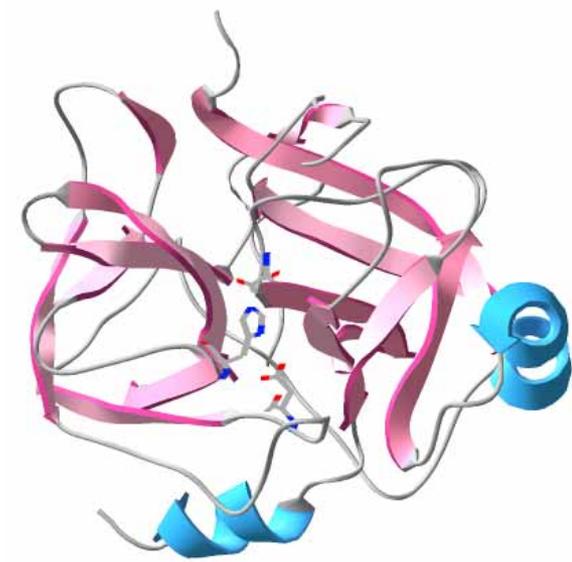
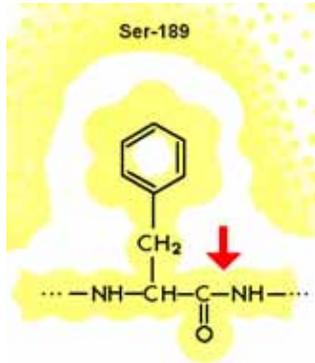


Зависимость активности ферментов (для удобства сравнения приведены активности, нормированные к единице) от pH;
1 — пепсин,
2 — рибонуклеаза,
3 — аргиназа

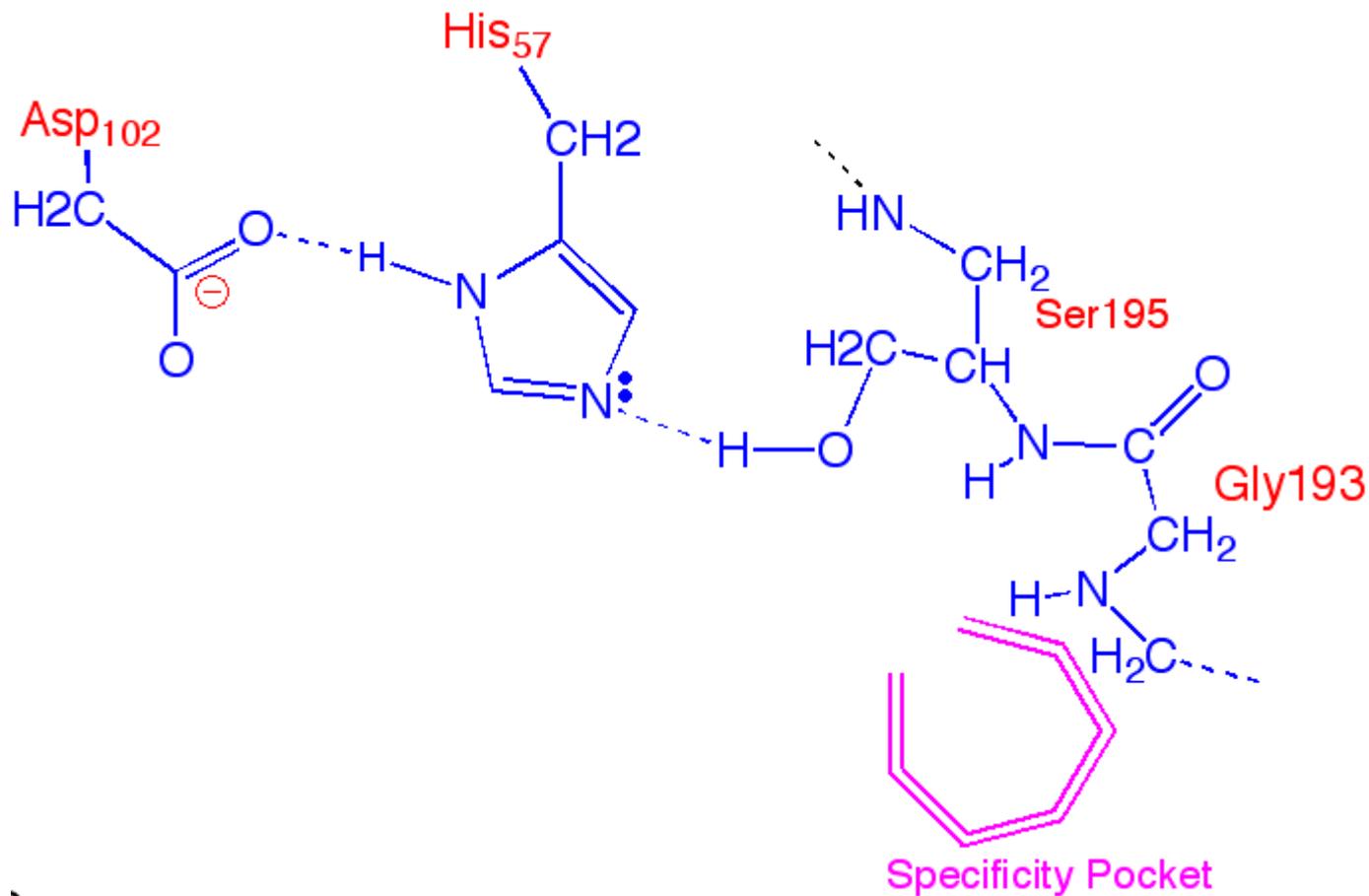
ТЕМПЕРАТУРА ВЛИЯЕТ НА РАБОТУ ФЕРМЕНТА



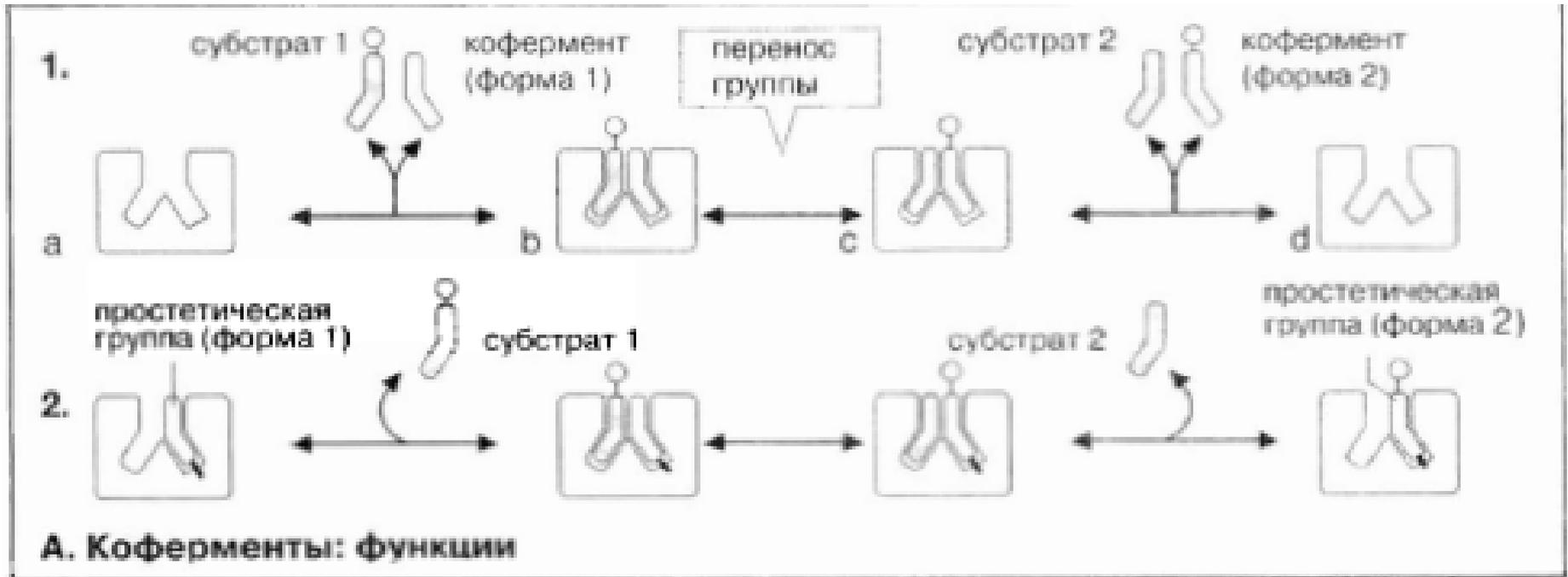
АКТИВНЫЙ ЦЕНТР ХИМОТРИПСИНА



АНИМАЦИЯ МЕХАНИЗМА КАТАЛИЗА ХИМОТРИПСИНОМ



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)	Биоцицин	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

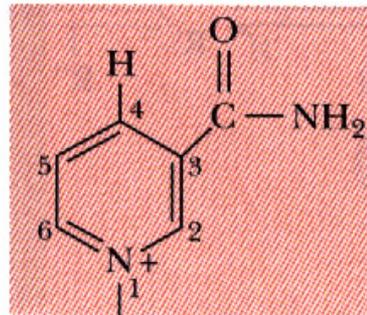
Коферменты и витамины

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^+

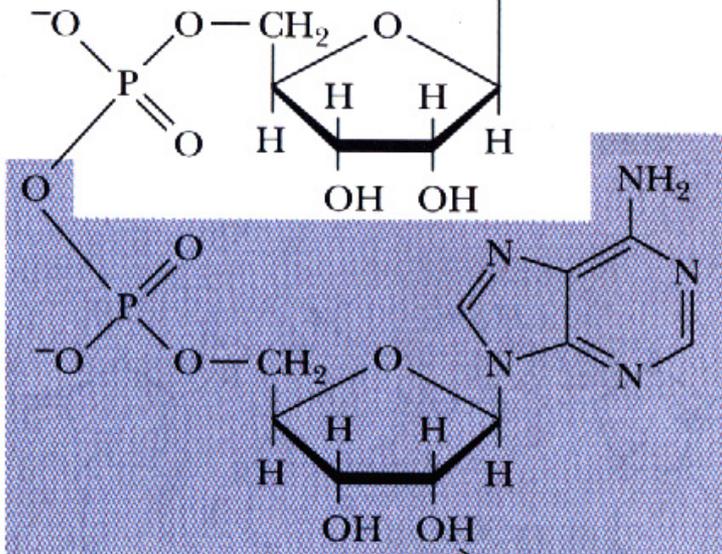
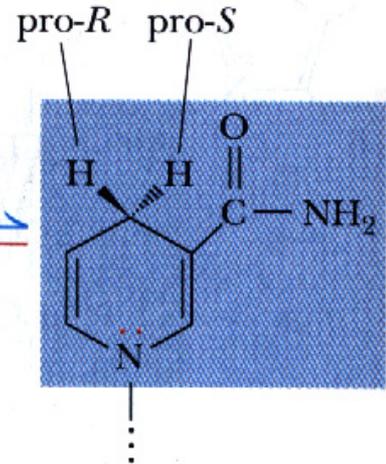
AMP

Nicotinamide
(oxidized form)

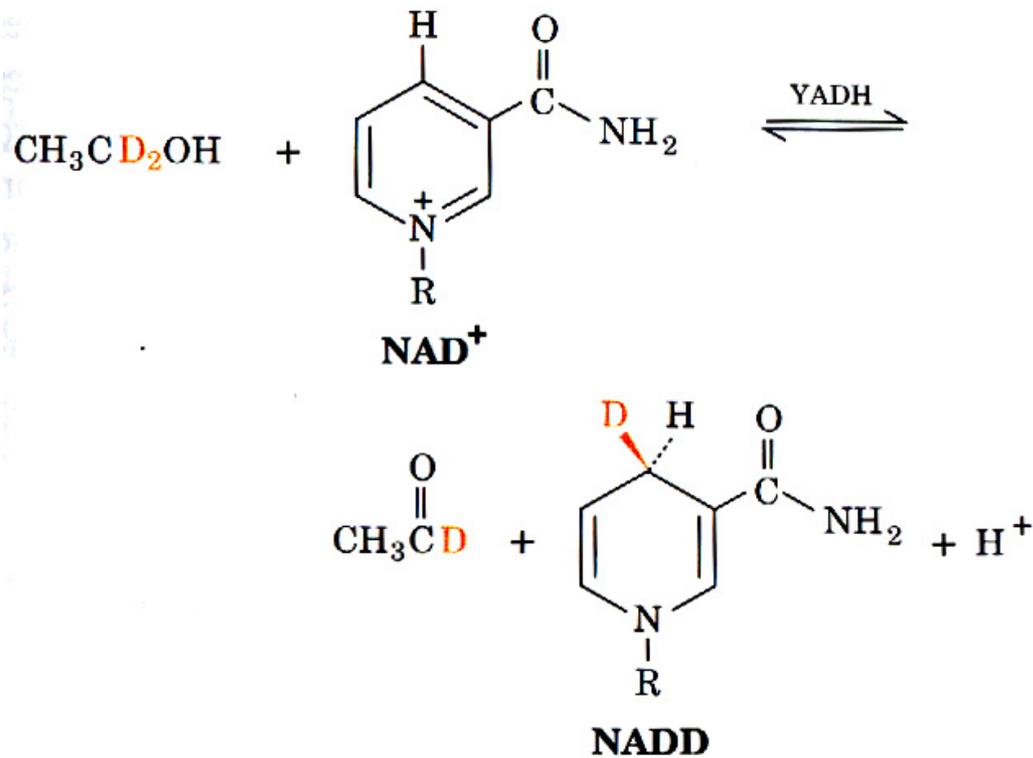


Hydride ion,
 H^-

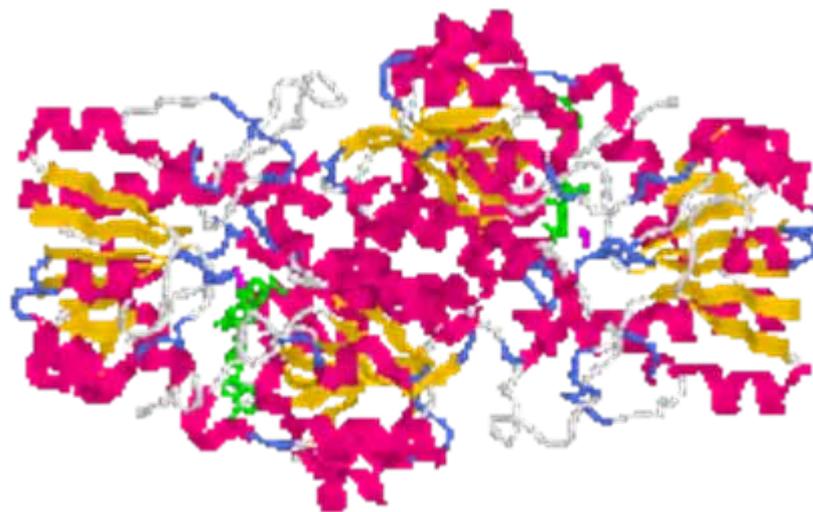
Nicotinamide
(reduced form)



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



ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА - СВЯЗЫВАНИЕ С КОФЕРМЕНТОМ ВЫЗЫВАЕТ КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ



Факторы, определяющие каталитическую эффективность ферментов

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

Инженерная энзимология

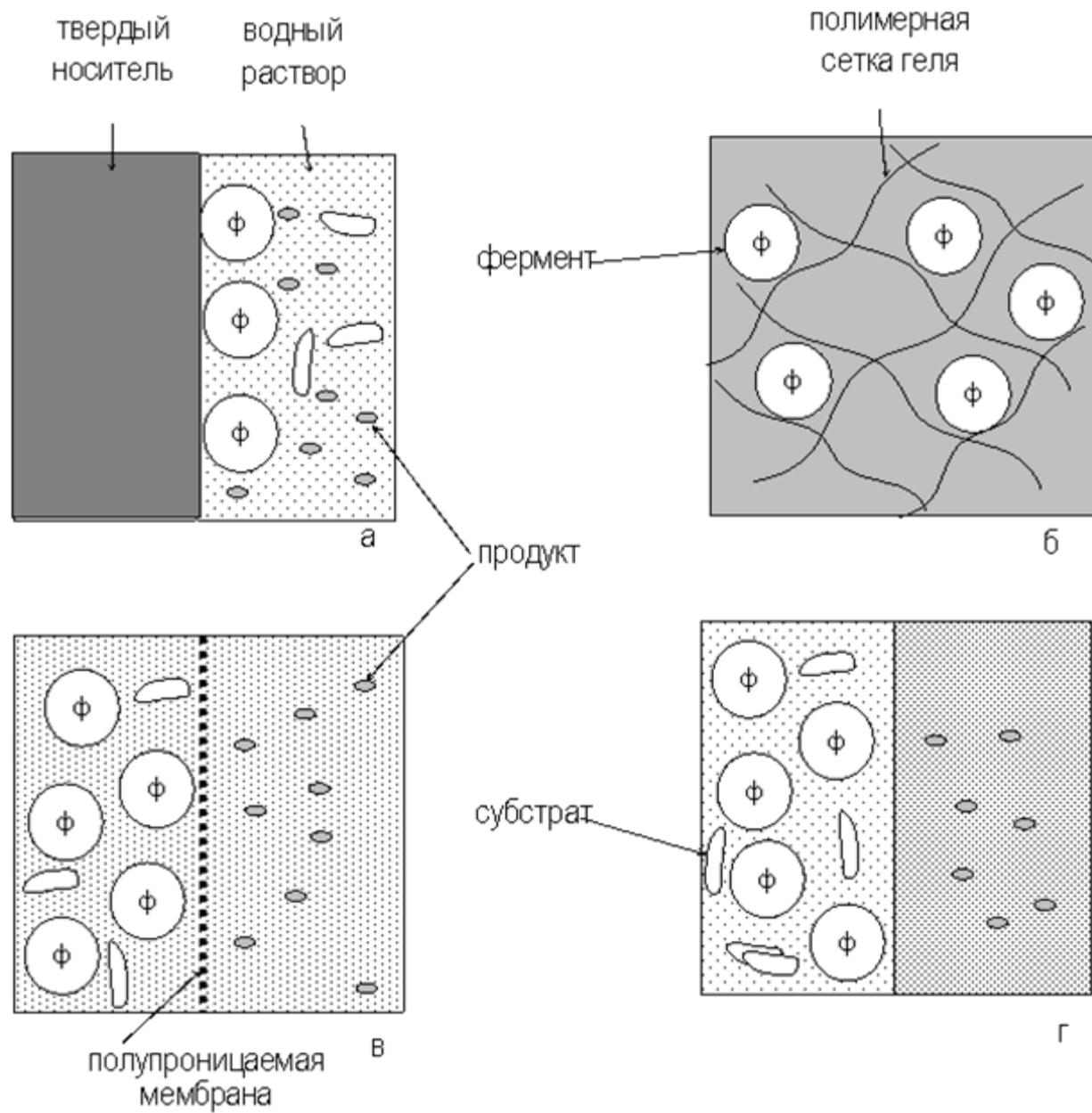
- **Тонкий органический синтез (фармацевтическое производство)**
- **Ферменты в пищевой промышленности**
 - пищевые добавки
 - производство продуктов питания
 - кормовые добавки
- **Ферменты в медицине**
 - Лекарственные препараты на основе ферментов
 - диагностические наборы и устройства
- **Аналитические 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**



Методы иммобилизации БАВ

Физические

Химические

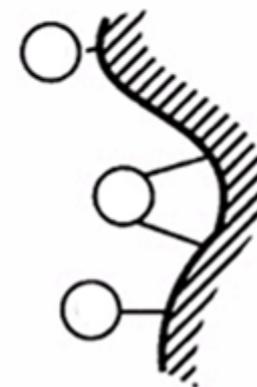
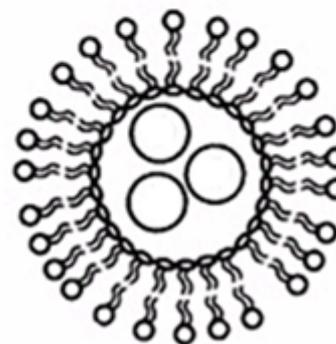
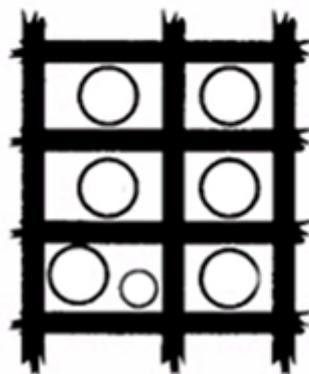
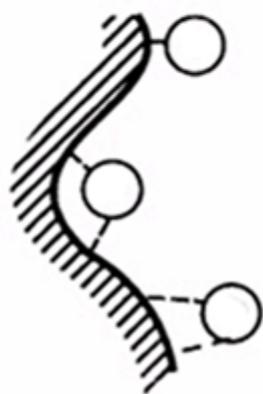
Адсорбция

Включение
в гель

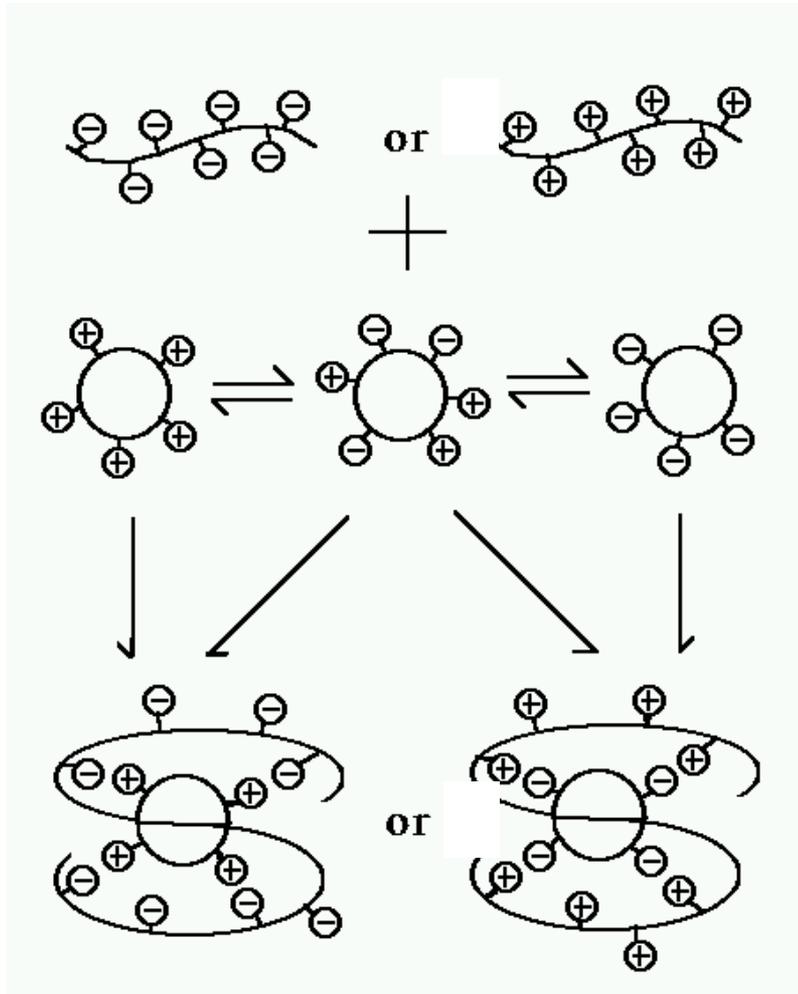
Инкапсули-
рование

Включение
в липосомы

Ковалентное
связывание



Образование фермент-ПЭ комплексов (регуляция свойств ферментов в различных средах)



Преимущества метода:

1. Методически несложный
2. Универсальность
3. Эффективность

Использование Хитозана в качестве стабилизирующей добавки в СМС

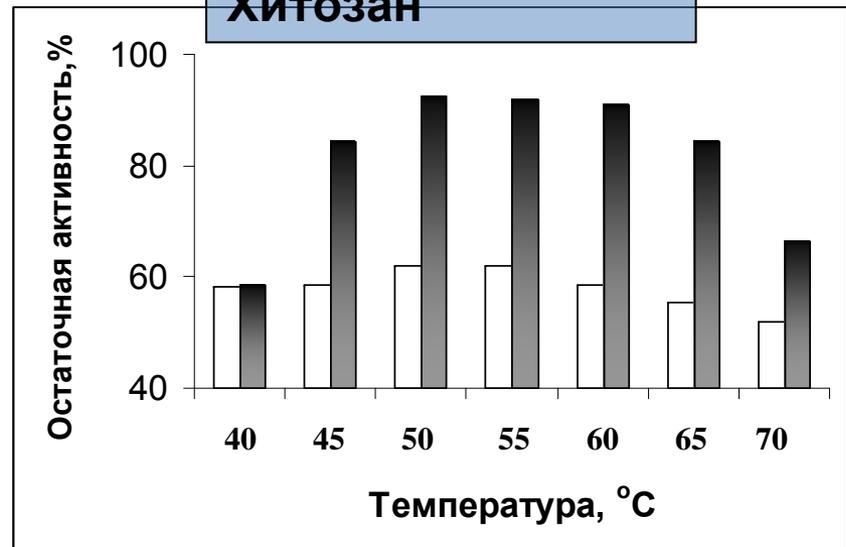
Комплексообразование с хитозаном:

- Увеличение начальной активности на 20–40%.
- Увеличение остаточной активности на 30–40%.

Общий эффект увеличения активности: 50-60%

Е.В.Кудряшова и др. 2009

Целлюлаза-Хитозан

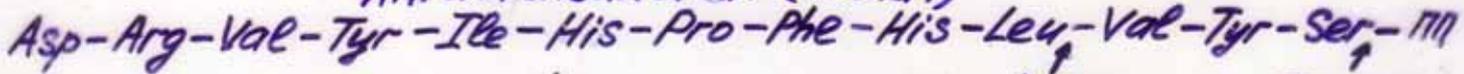


Снижение количества ферментов (ЩП и Ц) в 2 раза

Безопасность использования фермент – содержащих СМС

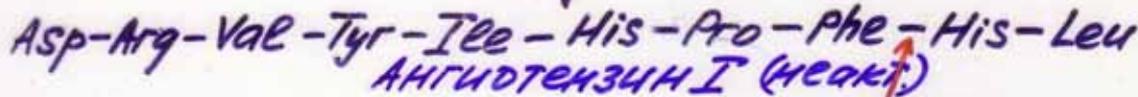
РЕГУЛЯЦИЯ КРОВОЯНОГО ДАВЛЕНИЯ

АНГИОТЕНЗИНОГЕН (неакт.)



↑ ренин

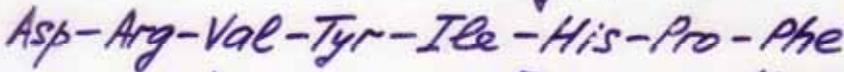
↑ трипсин



АНГИОТЕНЗИН I (неакт.)

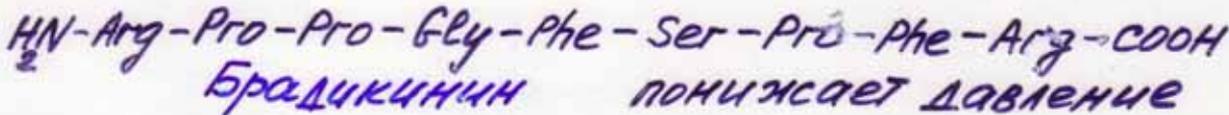
↑ АПФ

↓ АПФ



АНГИОТЕНЗИН II (акт.)

МОЩНЫЙ СТИМУЛЯТОР
КРОВ. ДАВЛЕНИЯ (повышает)



БРАДИКИНИН

Понижает давление

Ядовитая змея — южно-американская ямкоголовая гадюка парализует жертву.

Яд ⇒ резкое понижение давления.

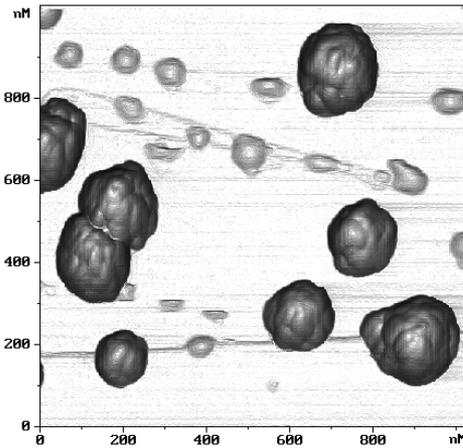
Выделяет особые пептиды, стимулирующие акт. бр., т.к. блокируют АПФ. и защищают бр. от инактив.

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

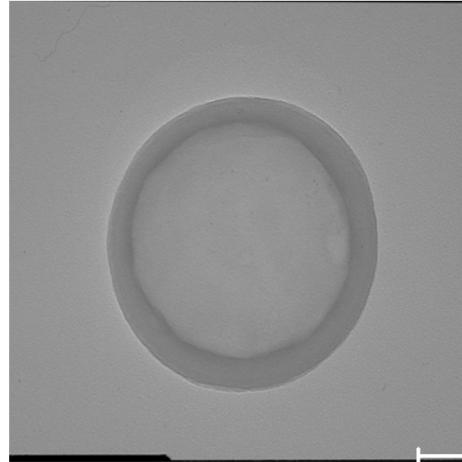


Синтезирован ряд пептидов, исп. в мед., напр., калтоприл. Он ингибирует АПФ ⇒ сниж. давл.

Группа «Пептидазы: механизмы действия и физиологическая активность» (руководитель О.А. Кост)



Атомно-силовая микроскопия



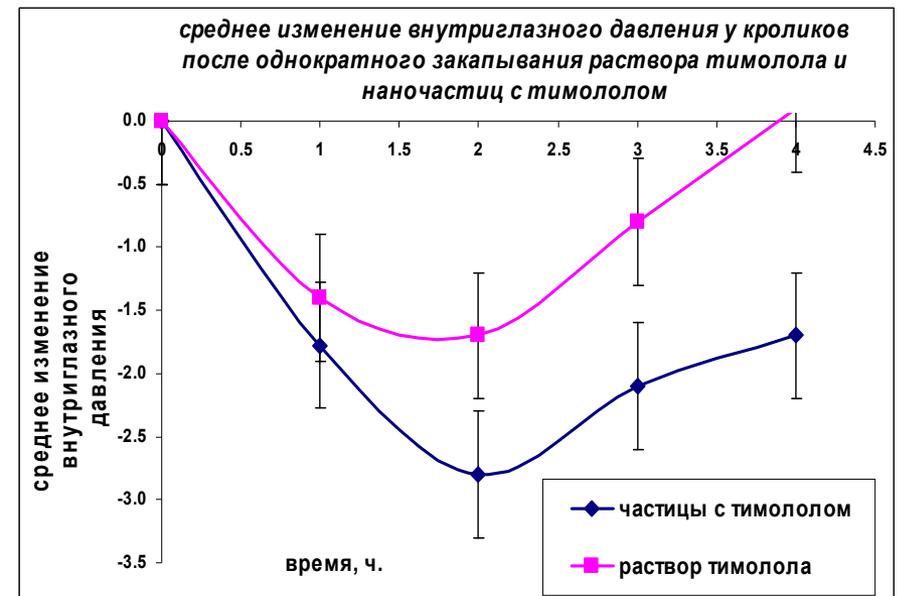
Проникающая электронная микроскопия



Кальций-фосфатные наночастицы –

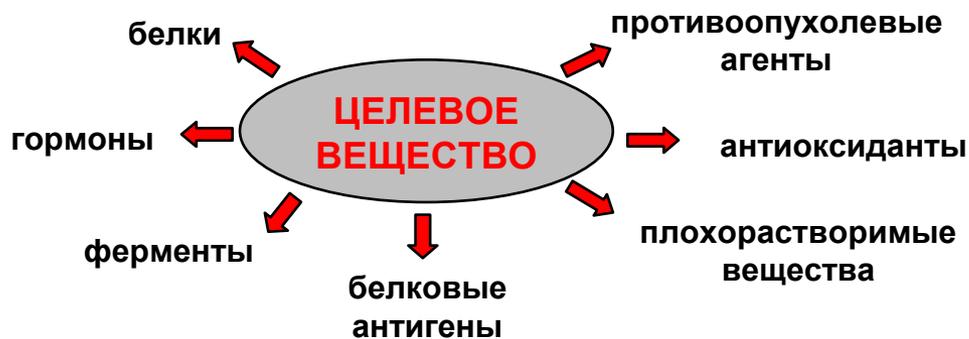
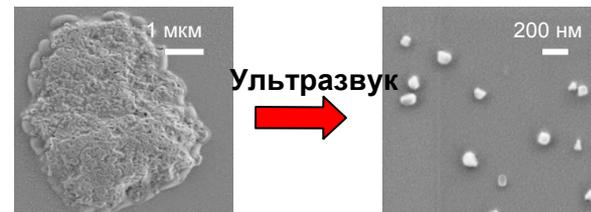
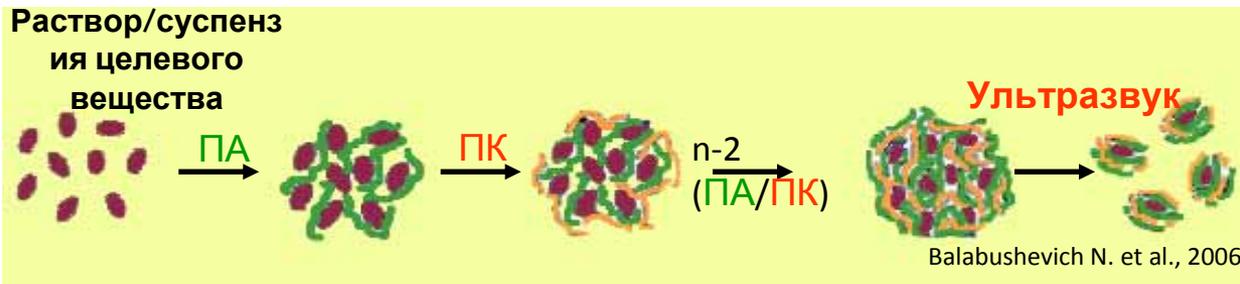
перспективные носители для офтальмологических лекарственных препаратов.

Представляют собой полые сферы с размерами от **40** до **600 нм**, которые можно изменять, варьируя условия получения частиц. Результаты тестирования наночастиц с коммерческим лекарственным препаратом малеатом тимолола на кроликах демонстрируют более **эффективное** и **продолжительное** действие **тимолола** в наночастицах по сравнению с водным раствором препарата.

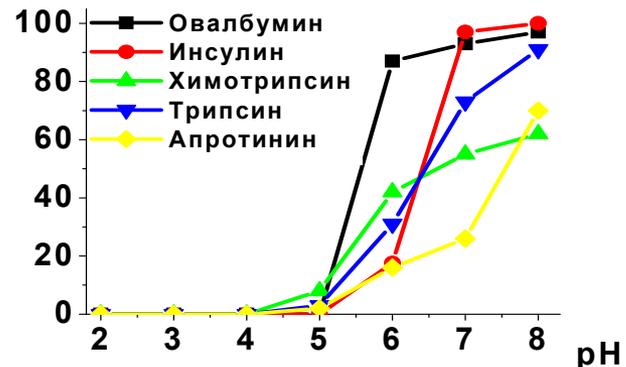


Стимул-чувствительные полиэлектролитные нано- и микрочастицы

Схема получения микрочастиц путем послойной адсорбции полиэлектролитов на комплексе (целевое вещество-полианион)



Высвобождение белка, %



Влияние pH на высвобождение белка из полиэлектролитных микрочастиц (время инкубации 1 ч).

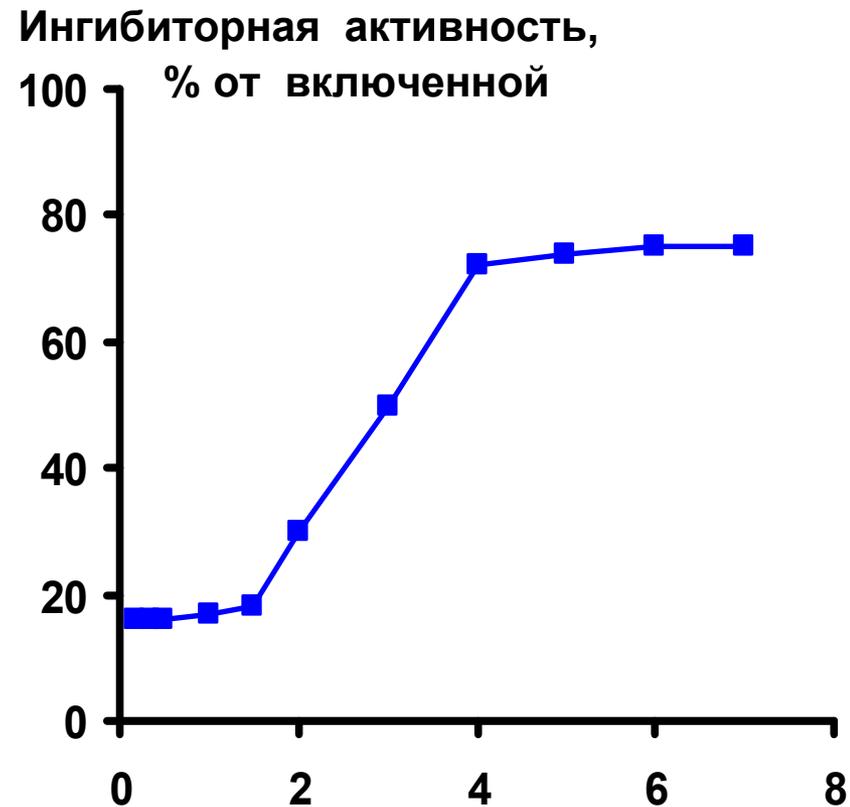
Полианионы (ПА):
 декстрансульфат
 хитозансульфат
 альгинат
 полистиролсульфонат

Поликатионы (ПК):
 протамин
 хитозан
 апротинин
 полиаллиламин

Биорастворимые полимерные пленки с ингибиторами протеиназ для местного применения



Кинетика высвобождения аprotинина из биорастворимых полимерных пленок



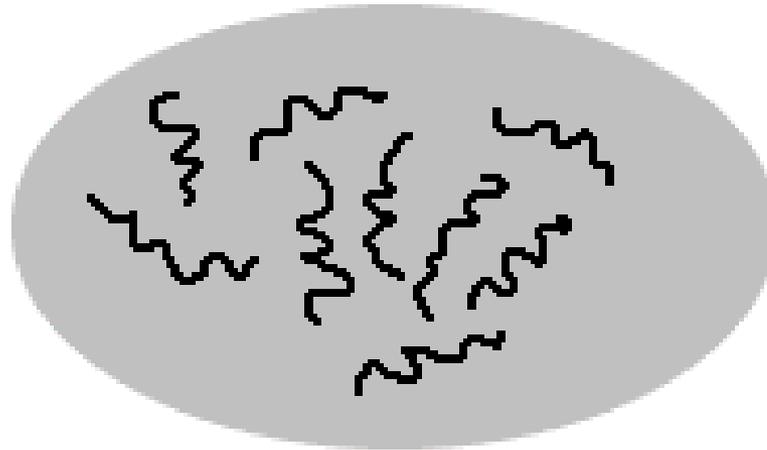
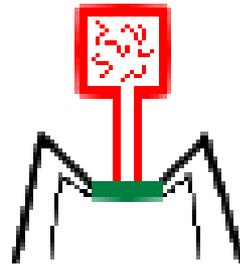
Преимущества биорастворимых лекарственных пленок

1. Улучшение хранения
2. Удобство применения (биоадгезивность, применение у детей, стариков, в ветеринарии)
3. Постепенное высвобождение лекарств
4. Улучшенная биодоступность
5. Сокращение расхода лекарственных средств
6. Ускорение достижения лечебного эффекта

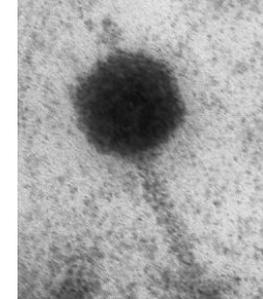
Н.И.Парионова и др.

Бактериофаги (фаги) – вирусы, способные инфицировать бактерии

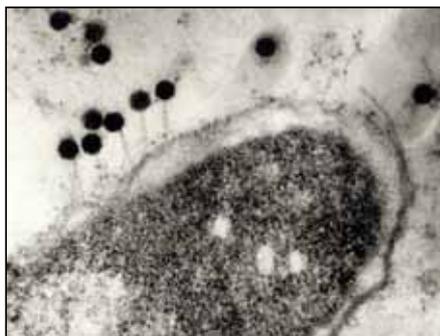
Отличаются от вирусов животных и растений



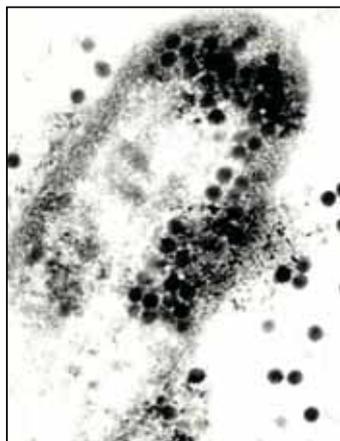
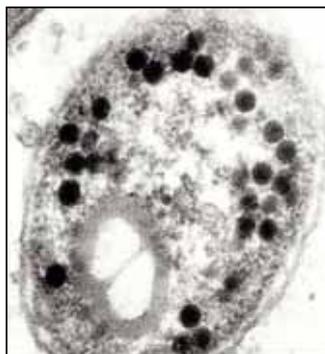
ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ПРОЦЕССА ДЕЙСТВИЯ ФАГА (КЛОН 6) НА КЛЕТКИ БАКТЕРИЙ *SALMONELLA TYPHIMURIUM*



20 min



30 min



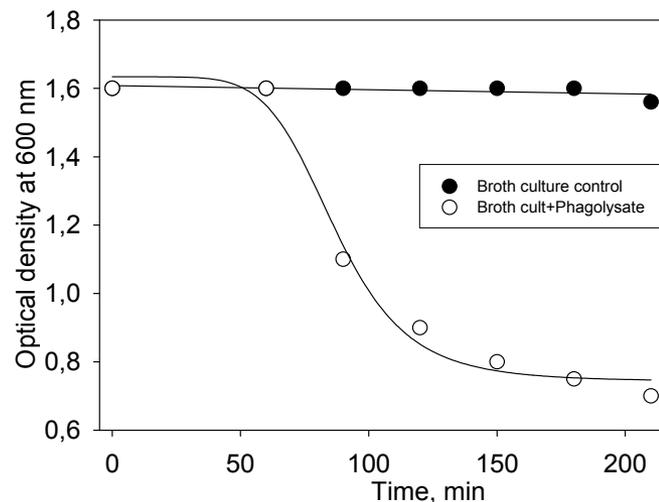
60 min



120 min

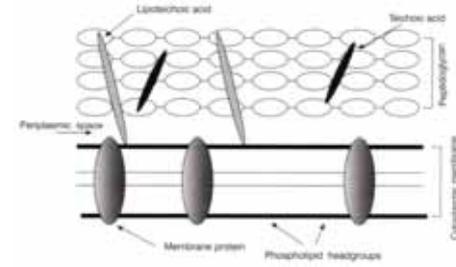
Клетки *S. typhimurium* остаются морфологически неизменными в течение 20 и 30 мин после инфицирования (**лизис не идет**), но генетический материал доставлен и фиджи размножаются внутри;

Лизис начинается через 60 мин и практически заканчивается через 120 мин.



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

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



Недостатки:

Чувствительность к Т очень высока (низкая стабильность):

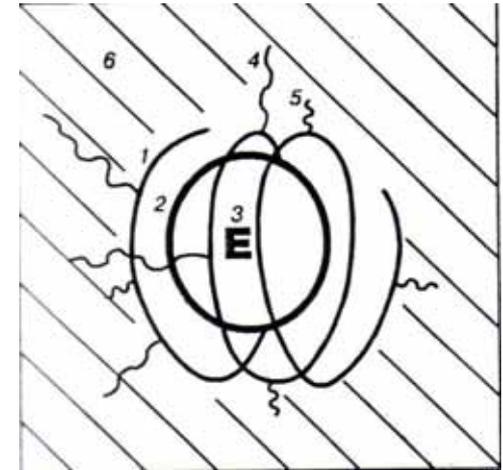
4°C - месяцы

20°C - часы

37°C - минуты



Зона лизиса под действием PlyC на газоне стрептококков



Мицеллярно-полимерная композиция защищает фермент

Основные стадии разработ препаратов ферментов

Выделение фермента из фагов

Очистка фермента

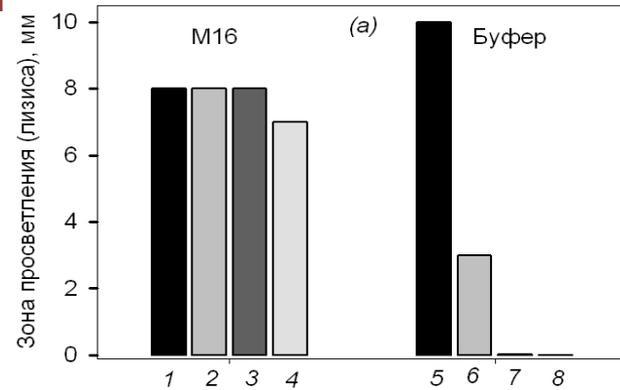
Стабилизация фермента

Испытания in vivo

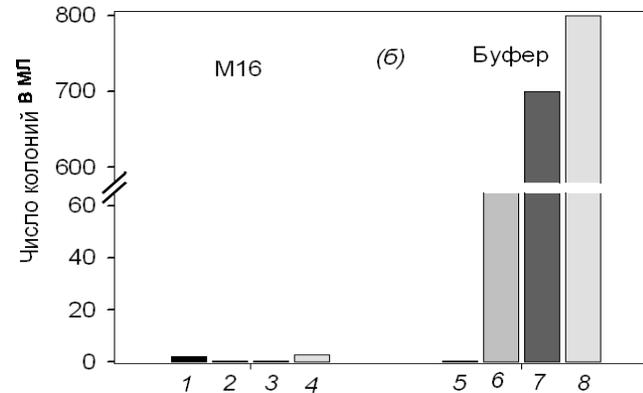
Высокоэффективный и стабильный
антибактериальный препарат



Коммерческие полоскания не эффективны против стрептококка А (слева нет зоны просветления на газоне). Биокатализатор PlyC эффективно уничтожает бактерии (справа зона просветления, в которой



Снижение
эффектив
ности



Рост
колоний

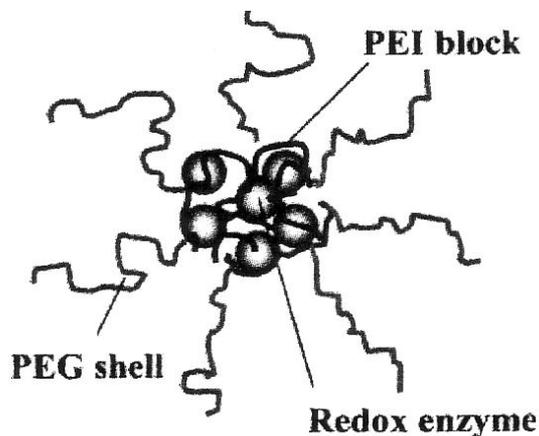
PlyC в мицеллярно-полиэлектролитной композиции M16 эффективно работает против стрептококка и через 2 дня (2), 2 недели (3), 2 месяца (4). Фермент без композиции теряет эффективность уже через 2 дня (6), наблюдается рост числа новых колоний патогена (6, 7, 8).

N.L.Klyachko, et al, 2006, 2008
L.Y.Filatova, et al. Biochimie 2010

Наночастицы ферментов-антиоксидантов для доставки в ЦНС

Антиоксиданты

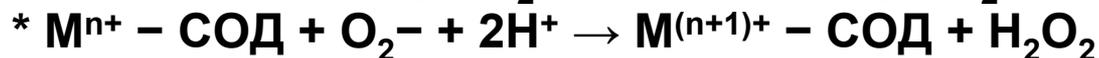
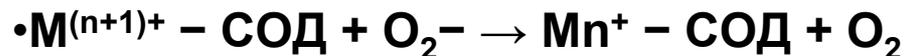
- Низкомолекулярные (витамин С, витамин Е, витамин А, убихинол, липоевая кислота)
- Антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза)



□ Каталаза



□ Супероксиддисмутаза (СОД)



где M = Cu (n=1) ; Mn (n=2) ; Fe (n=2) ; Ni (n=2)

Получение наночастиц на основе комплексов и конъюгатов

- один из способов создания стабильных препаратов ферментов для доставки в клетки

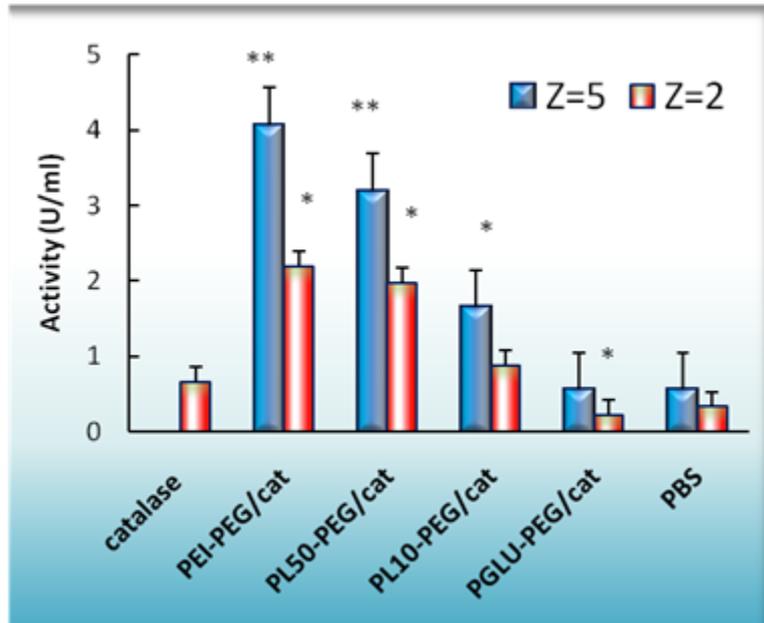
E.V.Batrakova, et al, Bioconj Chem, 2007
N.L.Klyachko, et al, 2010

Preservation of Enzymatic Activity in Cells

monocytes



1. Loading
2. Release
3. Activity assessment by spectrophotometry ($2 \text{ H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{O}_2$)



microglia



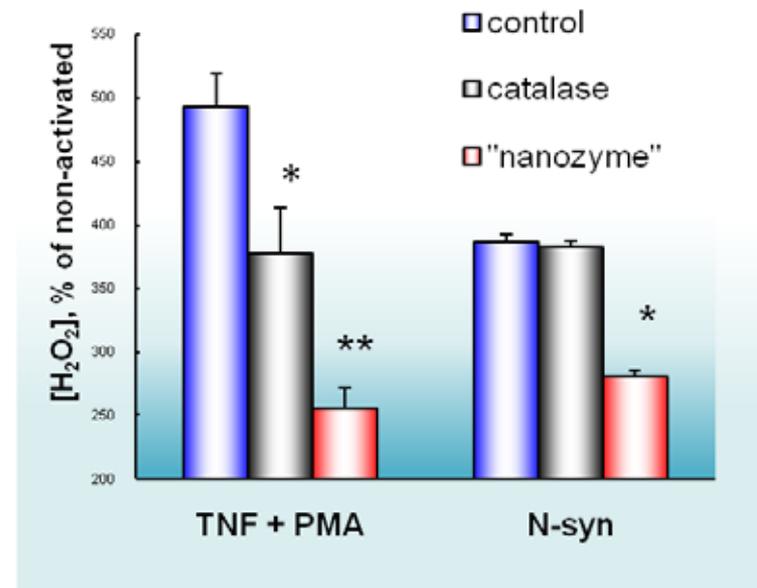
monocytes

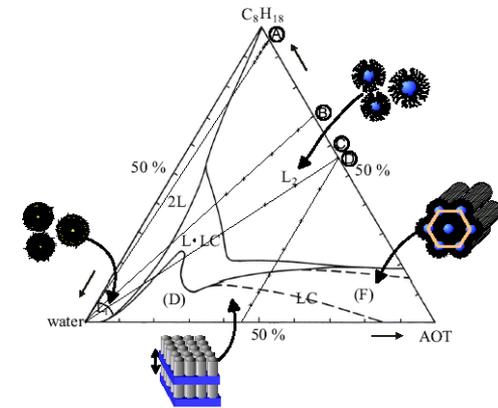
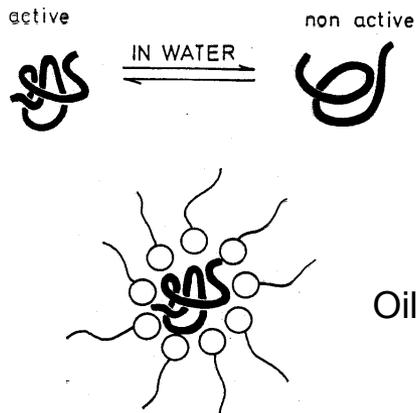


1. Pre-activation Loading,
2. Release



3. Treatment with media from monocytes





Ферменты в наноконтейнерах
Матрица определяет поведение фермента

Регуляция активности

Регуляция стабильности

•Micellar shell prevents protein from excessive fluctuations

K. Martinek, A.V.Levashov, N.L.Klyachko, Science, 1982
N.L.Klyachko, A.V.Levashov Curr. Opin. Colloid Int. Sci., 2003
N.L.Klyachko, I.G.Gazaryan, et al. J. Biol. Chem., 2005
N.L.Klyachko, A.V.Levashov ACS Symposium Series No.986, 2008.

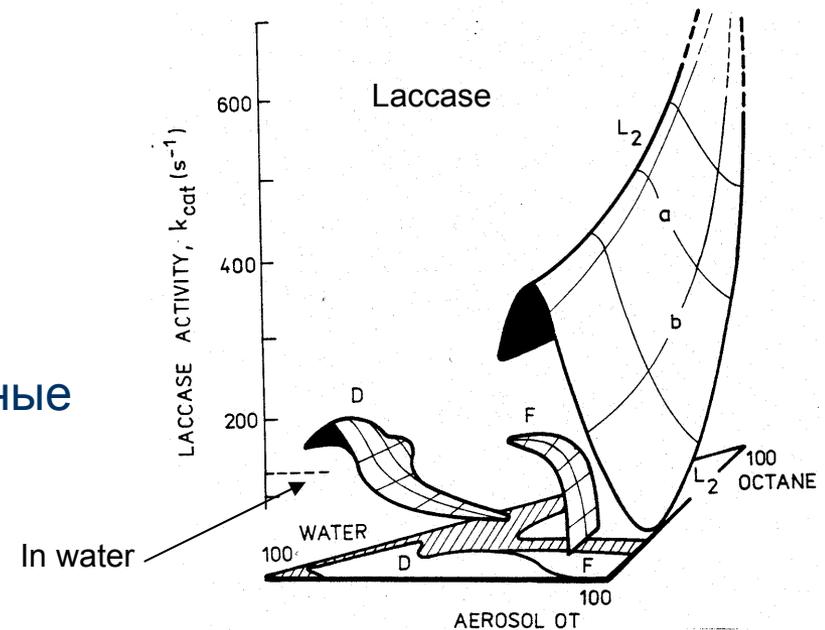
ФЕРМЕНТЫ В НАНОЭМУЛЬСИЯХ

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

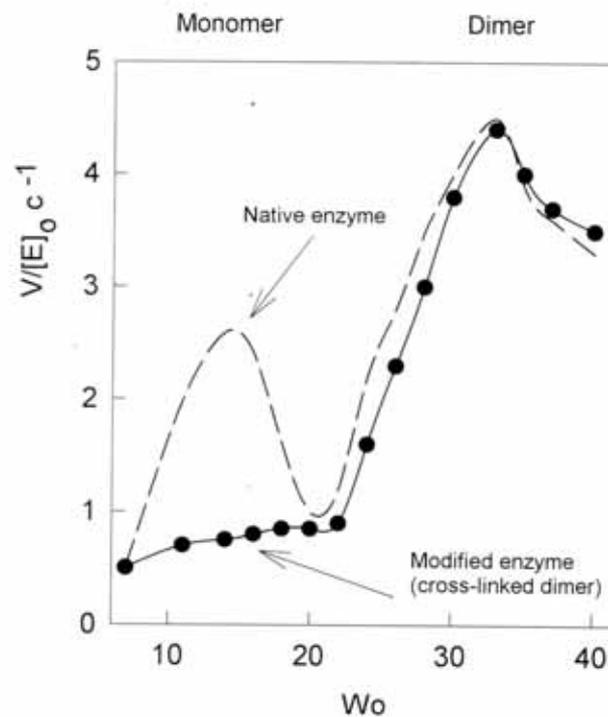
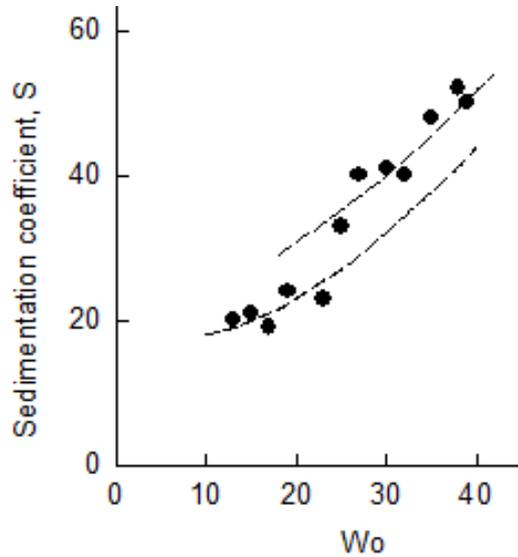
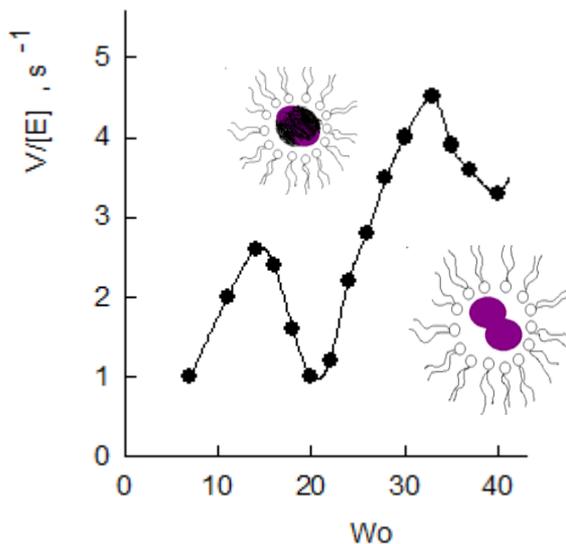
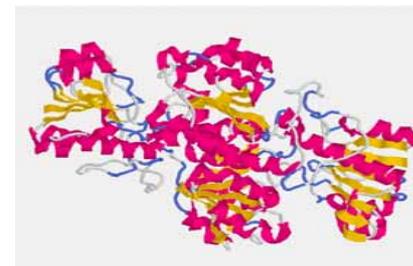


Выявлены свойства, которые сложно или невозможно проверить в водных растворах:

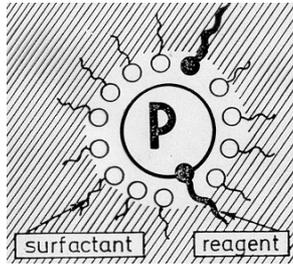
1. Проявление ферментом суперактивности
2. Регуляция структуры, активности и стабильности (диссоциация на активные субъединицы и/или ассоциация в надмолекулярные комплексы, в том числе, между несколькими белками)
3. Проявление рядом ферментов «мембраночувствительности» и возможностей регуляции



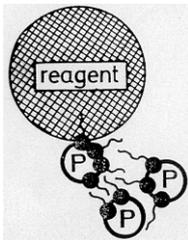
Формиатдегидрогеназа а диссоциирует в наноэмульсиях (мономеры активны)



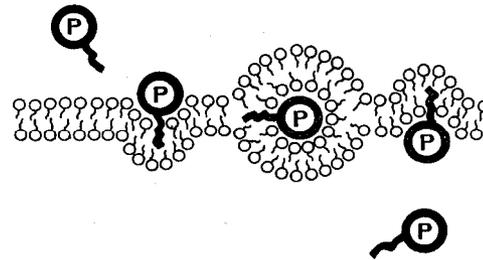
Манипуляции с ферментом



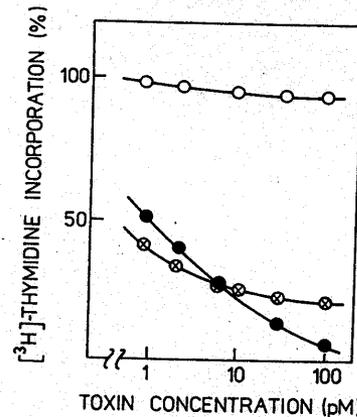
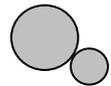
In nanoemulsion



In water



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

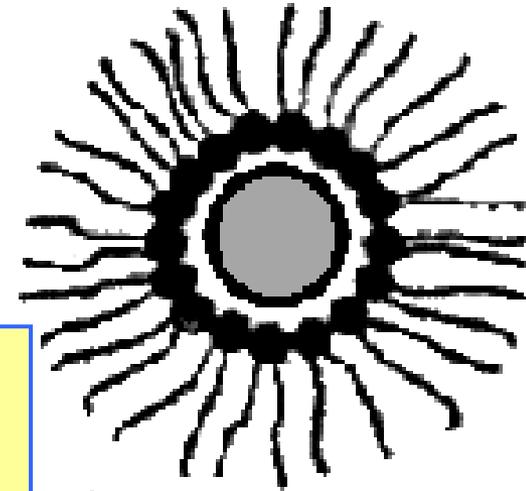
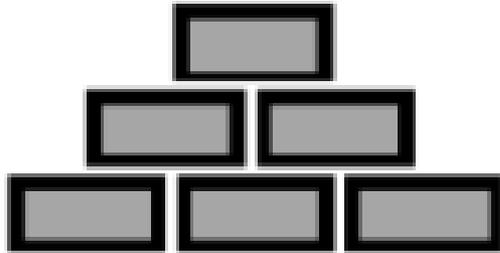


Non-modified ricin A-Chain

Stearic acid acylated ricin A-Chain

Native AB-chains toxin

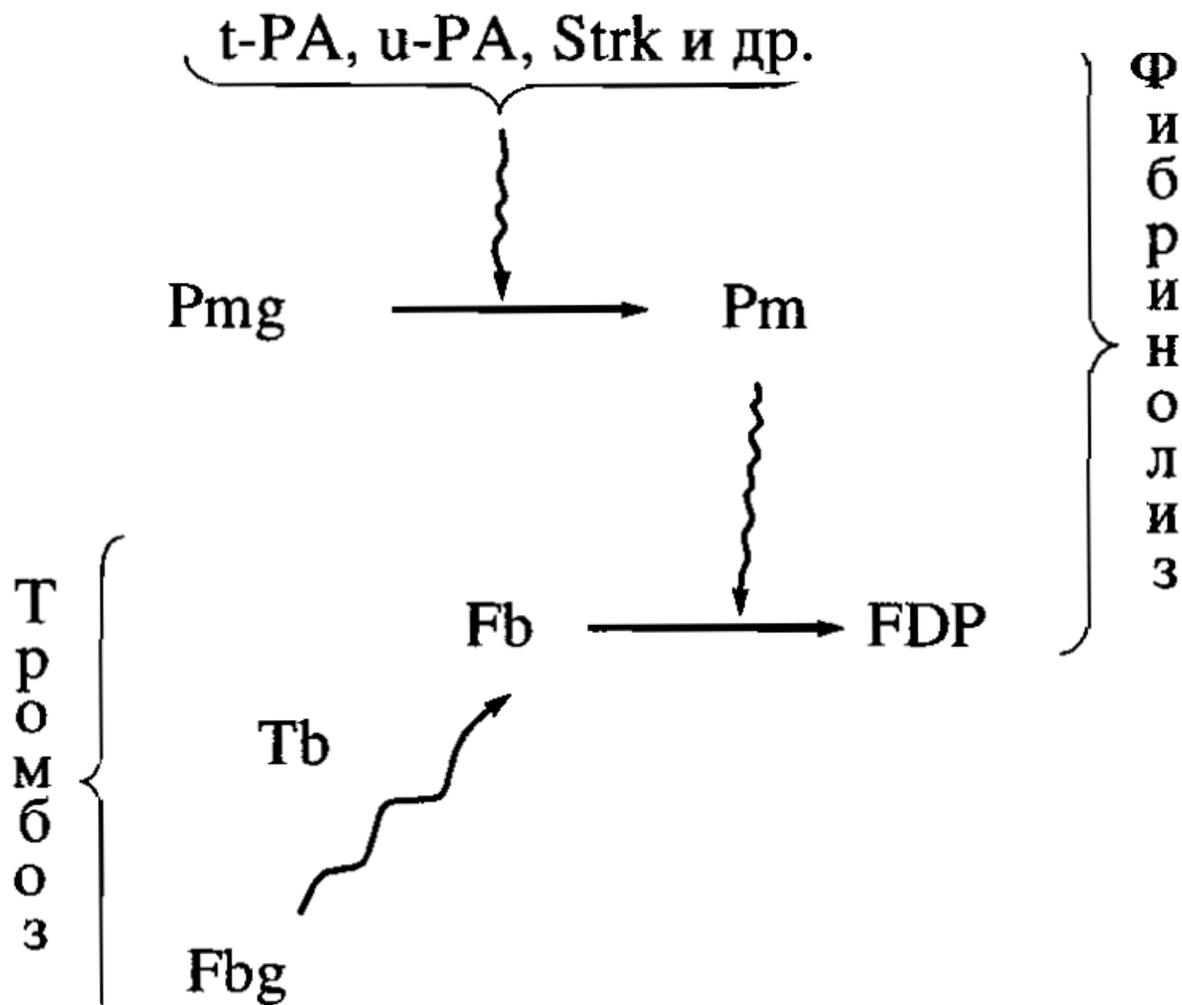
Мицеллярный подход: сворачивание телец включения белков



Преимущества:

- **Подбор оптимальных условий сворачивания;**
- **Возможность изолировать молекулу фермента в отдельной мицелле;**
- **Предотвращение агрегации и образования межмолекулярных S-S связей**

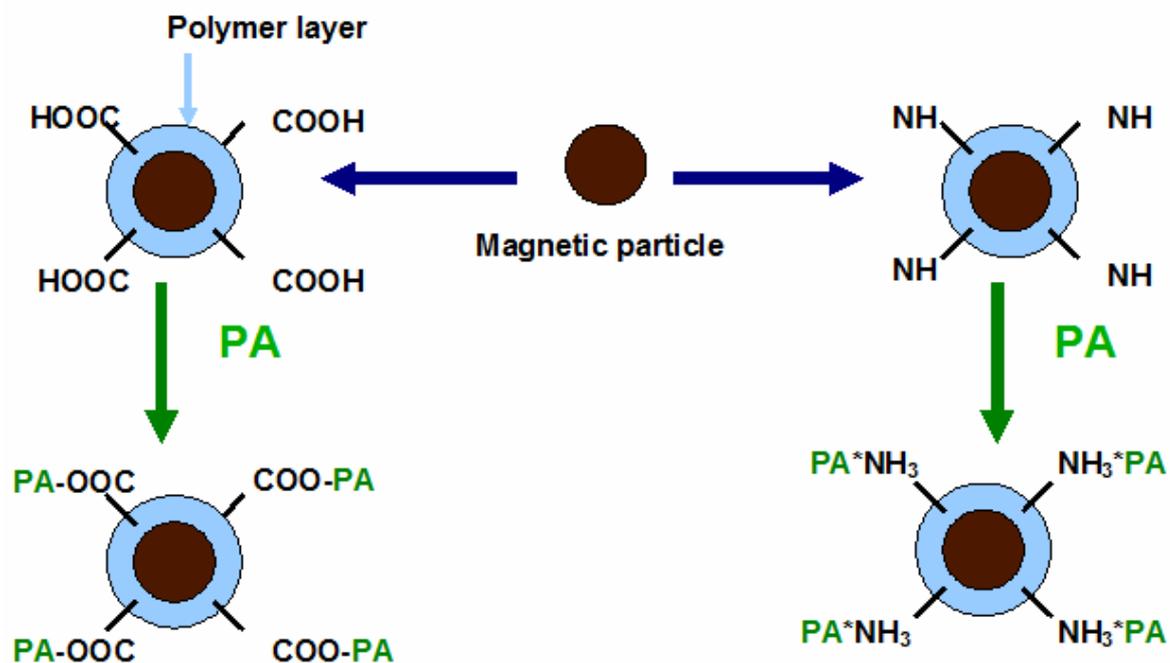
ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРОМБОЛИЗИСА



И.В.Березин, К.Мартинек и др.

Ленинская премия 1982 г.

АТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА (Pm-SK) НА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ

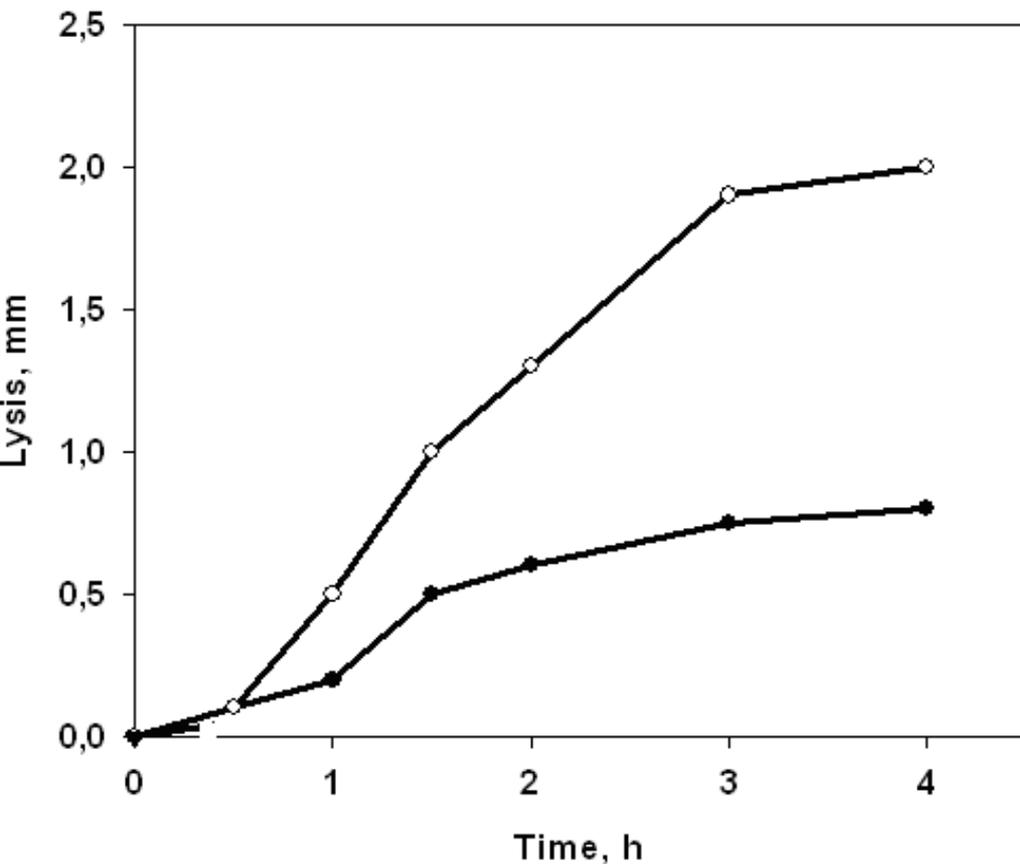
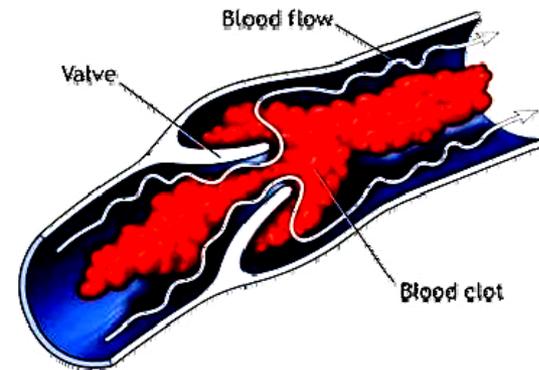


Р.Б.Айсина и др.

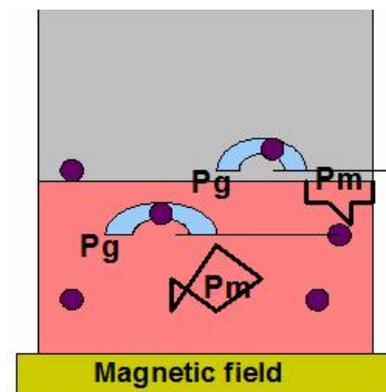
АТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА (Pm-SK) НА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ

Эффективный тромболитический агент

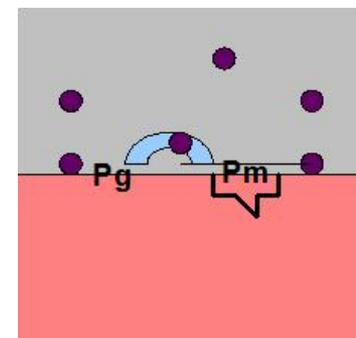
Фибринолитическая активность
(лизис фибринового сгустка)



Магнитное поле



Нет магнитного поля

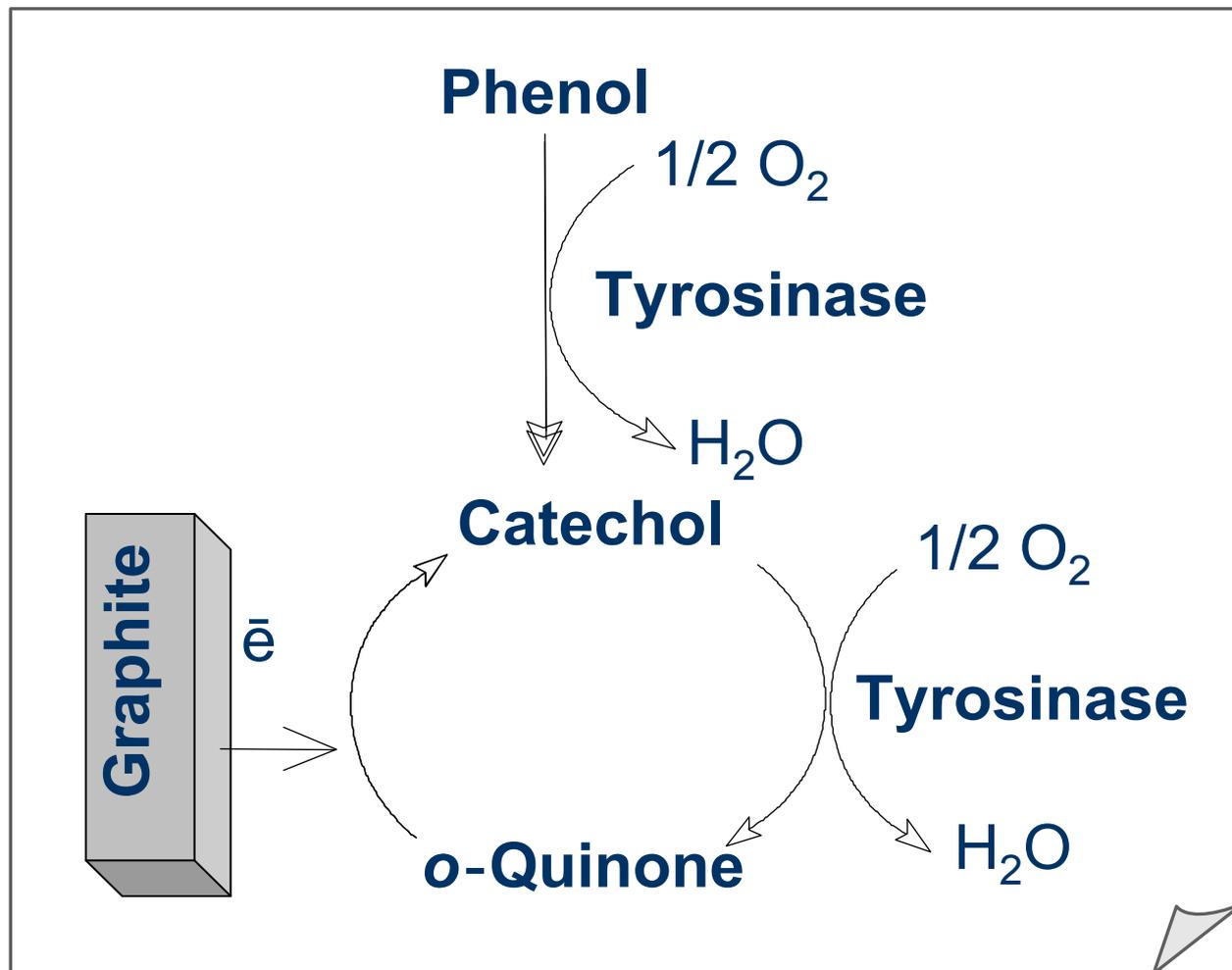


Р.Б. Айсина и др.

ФЕРМЕНТЫ В АНАЛИЗЕ

- Высокая чувствительность
- Высокая селективность

Тирозиназные сенсоры

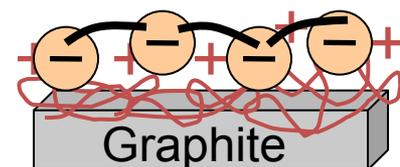


Предел обнаружения
фенола: **6 nM**

Линейность:
 $1 \cdot 10^{-8} M - 1 \cdot 10^{-5} M$

Чувствительность:
 $0,9 A/(M \cdot cm^2)$

Конструкция:



 - PDDA

 - Тирозиназа

 - ГА

Определение нейротоксинов

(органофосфатов и карбаматов) в воде, почве, еде (легко, быстро, в автоматическом режиме)



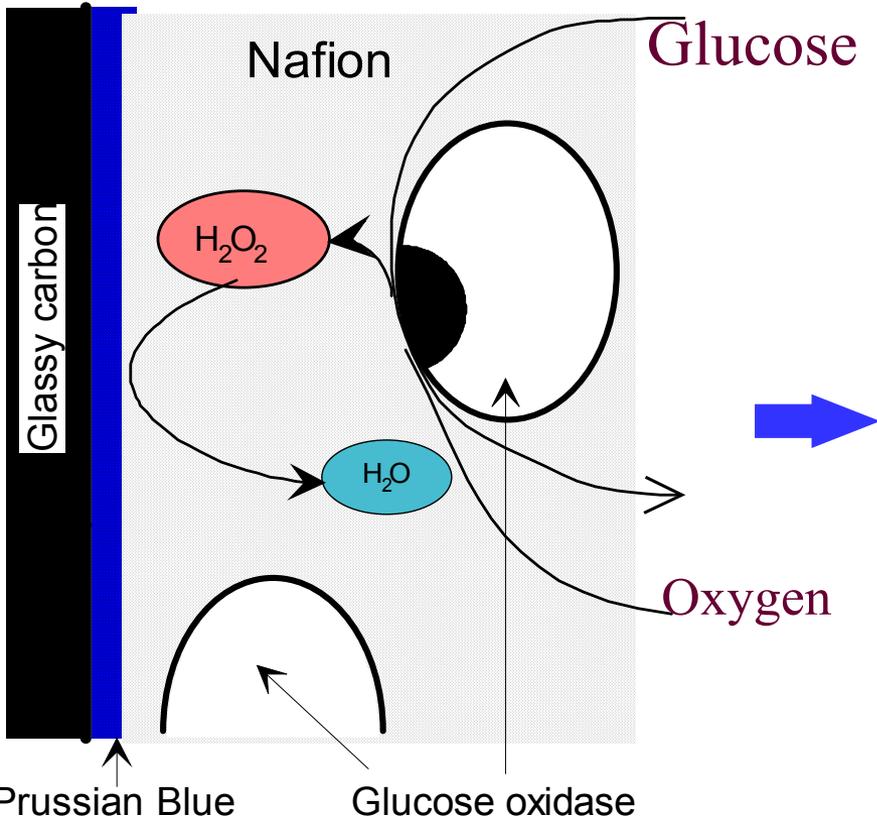
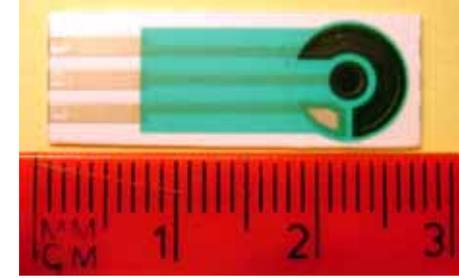
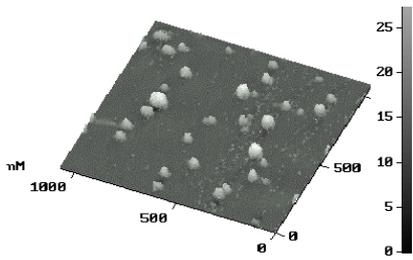
Реагенты для селективного анализа стабильны



- **Discriminative analysis of neurotoxins**
- **Quantitative analysis**
- **Sensitivity in nanomolar level**
- **Fast analysis in <30 minutes**
- **Easy sample preparation and load**

*И.Н.Курочкин и др.б
2007*

Биосенсоры, основанные на электрокатализе (наноструктурированные поверхности)



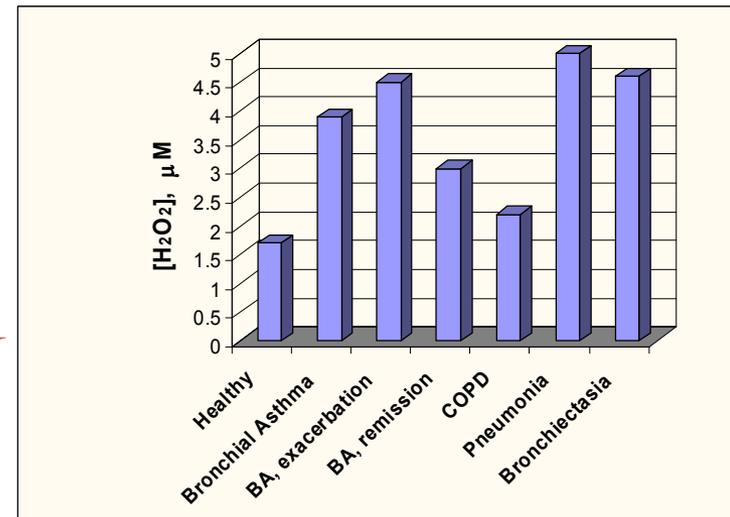
A.A.Karyakin, et al, 2007

Non-invasive diagnostic

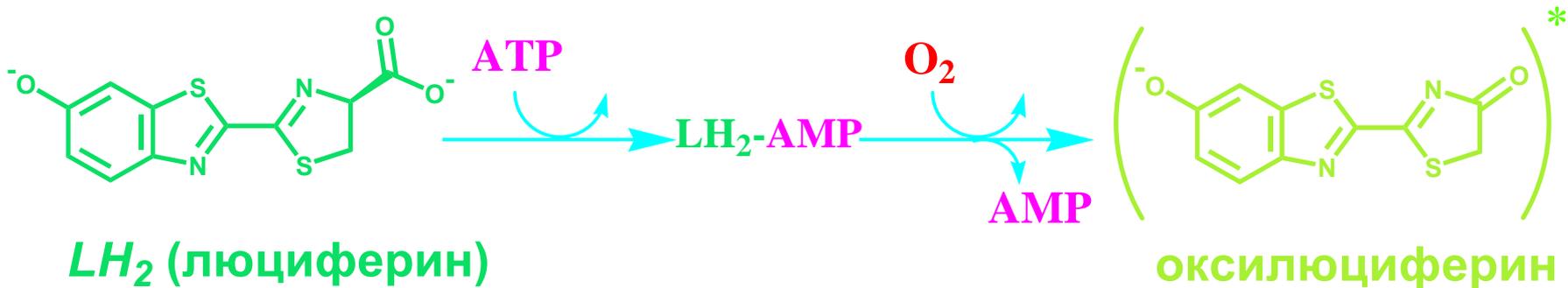
Lactate in sweat



Hydrogen peroxide in EBC



Биolumинесцентная реакция, катализируемая люциферазами светляков



Высокая специфичность к АТФ, высокий квантовый выход → высокочувствительный анализ АТФ (до 10^{-15} моль/образец)

$\lambda_{max} = 540-570$ нм

Определение АТР – области применения

- Контроль за скоростью ферментации
пищевая и фарм. пром, производство
напитков
- Обнаружение микробного заражения
Контроль качества продуктов в
производстве пищи, лекарств, косметики и т.д.
- Измерение биомассы в воде
Контроль за процессами обработки сточных
вод
- Детекция наличия жизни
Космические исследования
- Определение креатинфосфокиназы в сыворотке
крови (КФК синтез АТР, люцифераза использует АТР)
Медицина. Повышение конц КФК - инфаркт

Белки – настраиваемые «кирпичики»

Мутантные белки

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

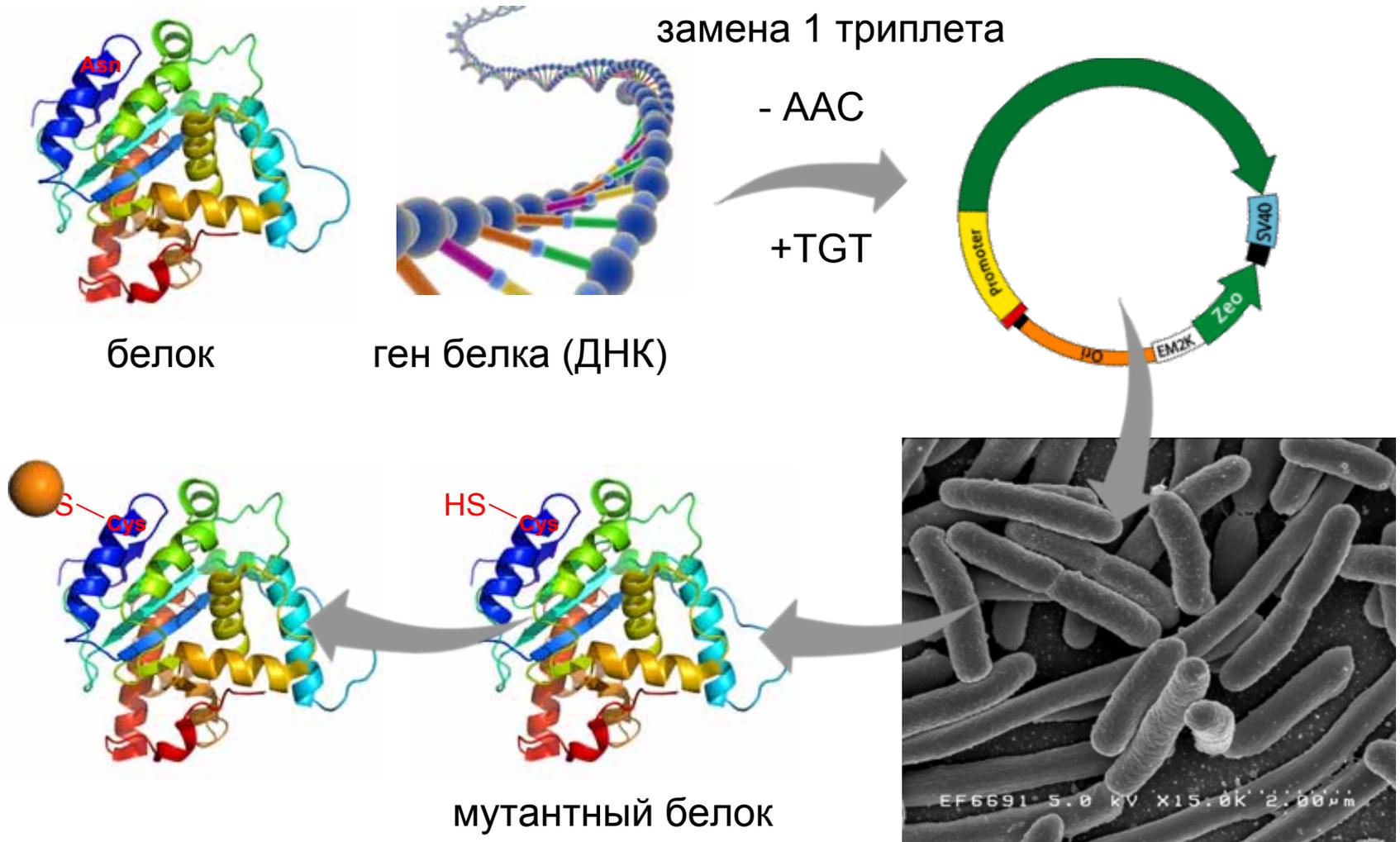
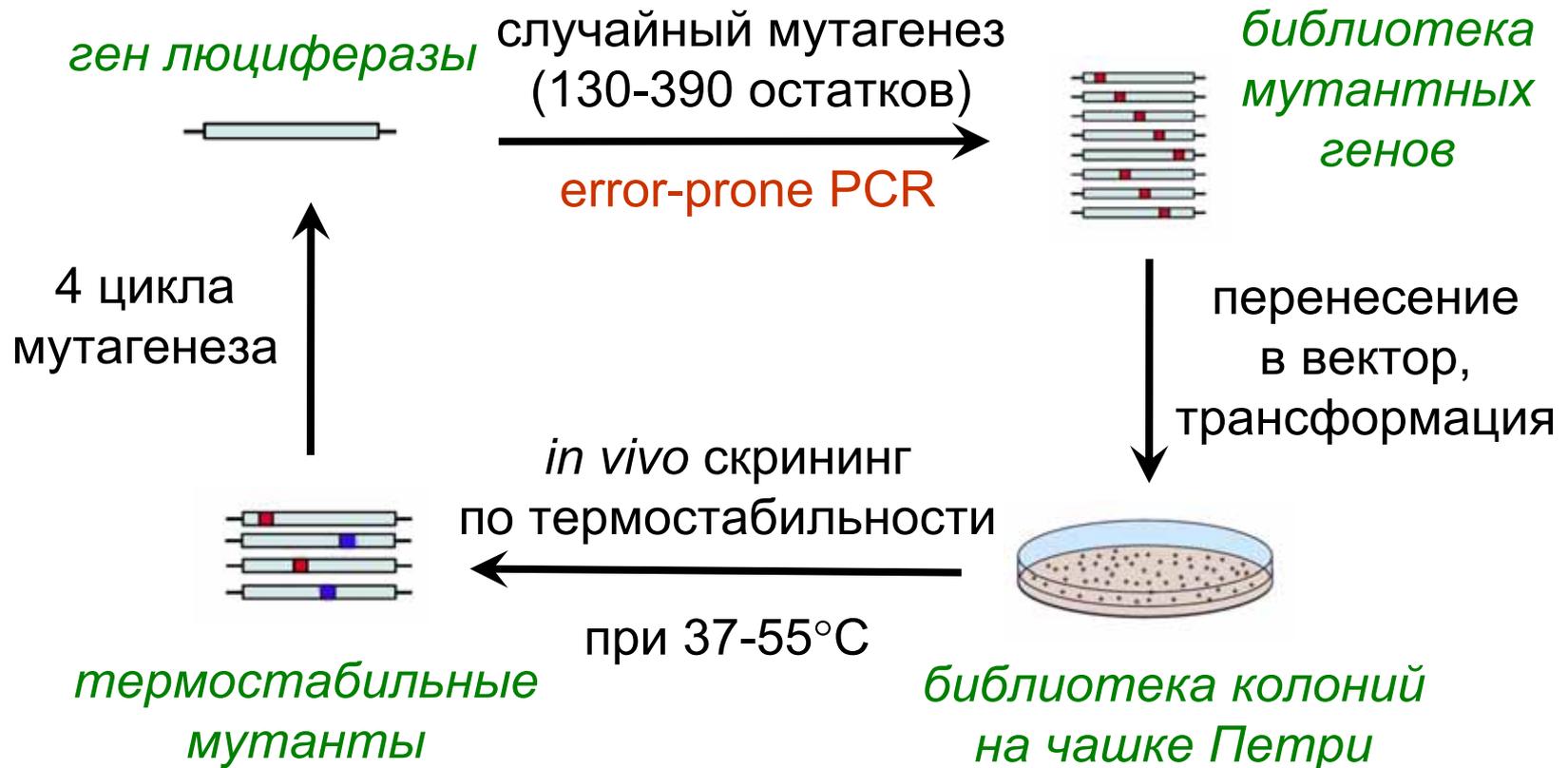
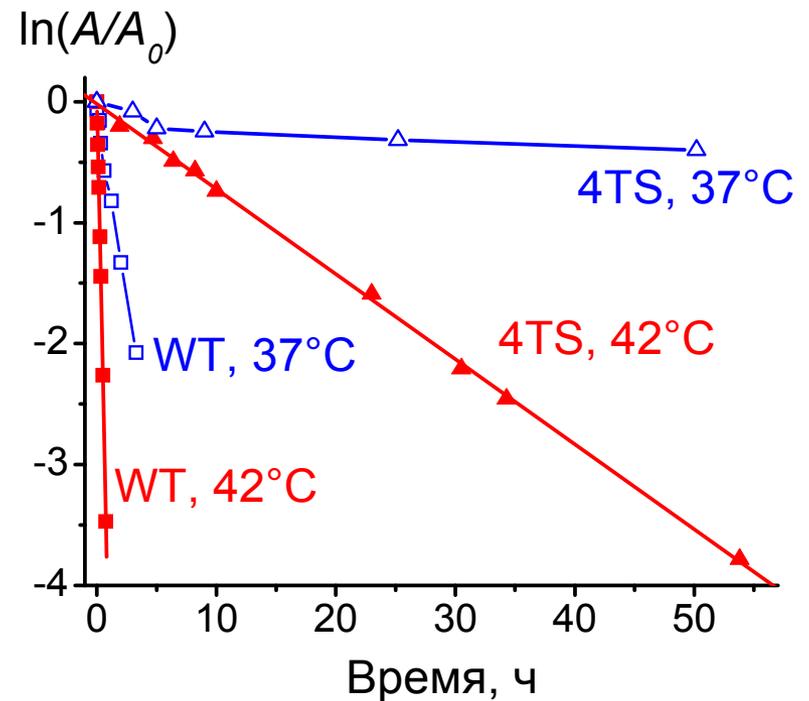
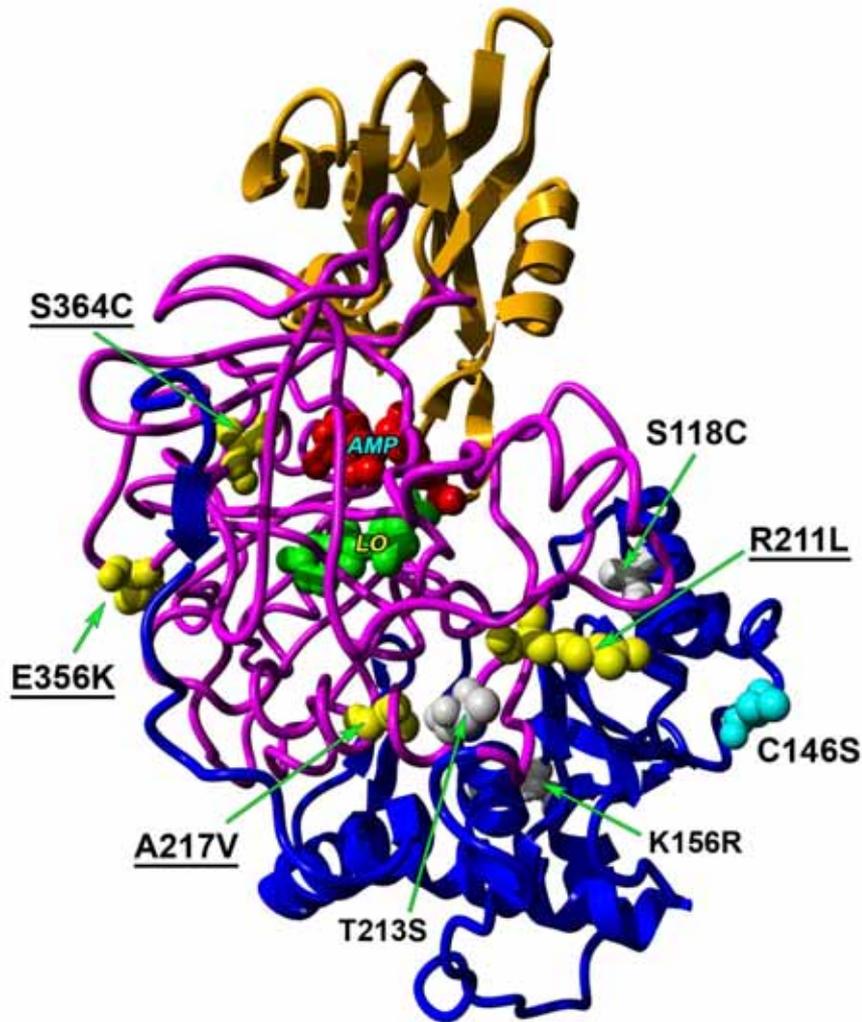


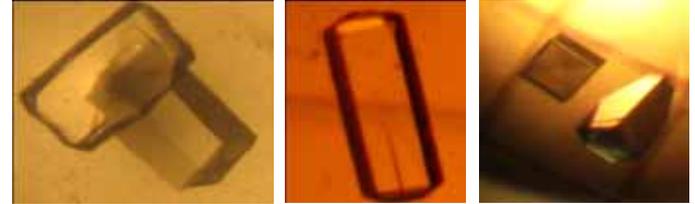
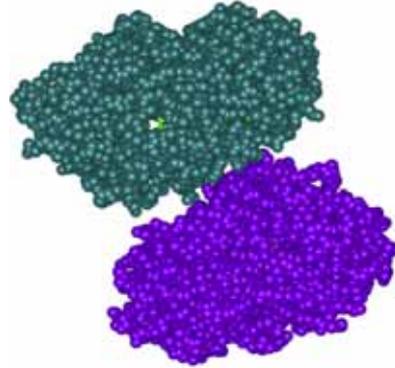
Схема повышения термостабильности люциферазы методом случайного мутагенеза



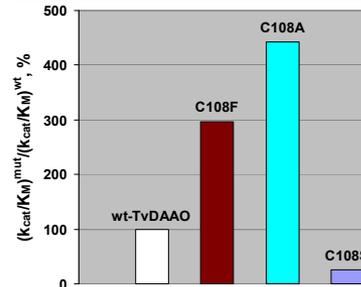
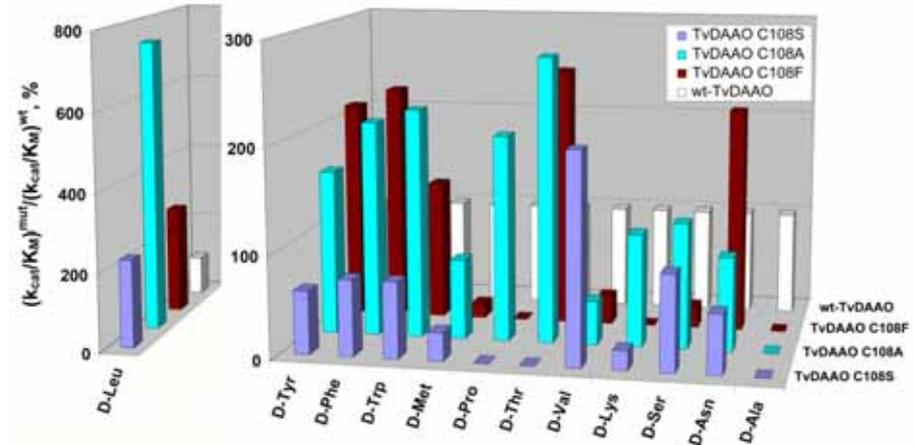
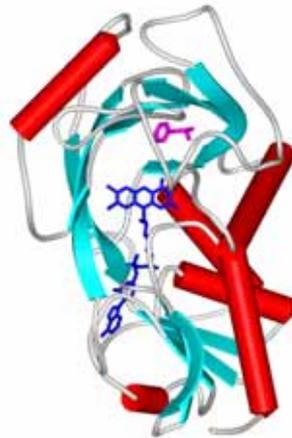
Расположение замен мутанта 4TS в структуре люциферазы и термостабильность ферментов



Исследование структуры и белковая инженерия оксидоредуктаз



Кристаллы ферментов, выращенные в космосе



Получение рекомбинантных ферментов

В.И. Тишков и др.

Улучшение свойств рекомбинантных ферментов

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!