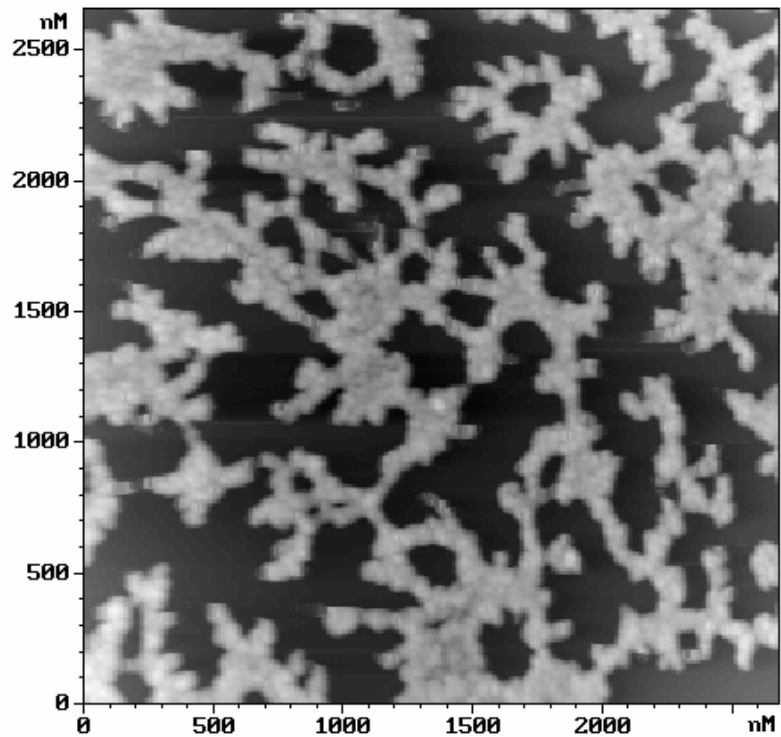

Ферменты-каталитически функционализованные наночастицы

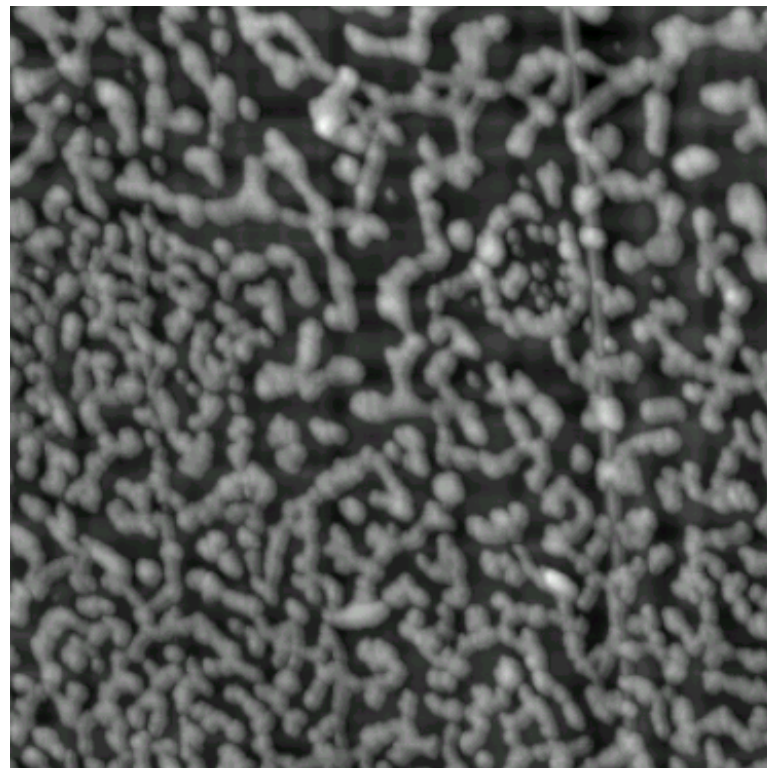


Нанотехнология: атомно-силовая микроскопия белков

Создание афинных поверхностей



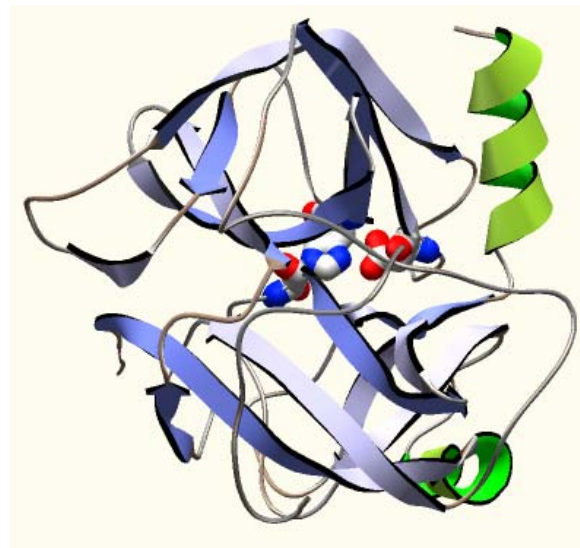
Визуализация молекул



Chymotrypsin and Streptogrisin

- Sequences are absolutely different

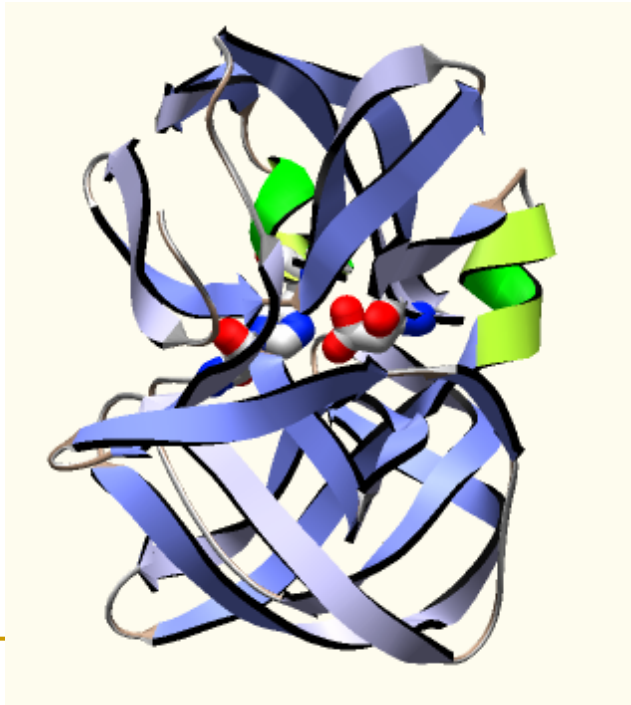
:



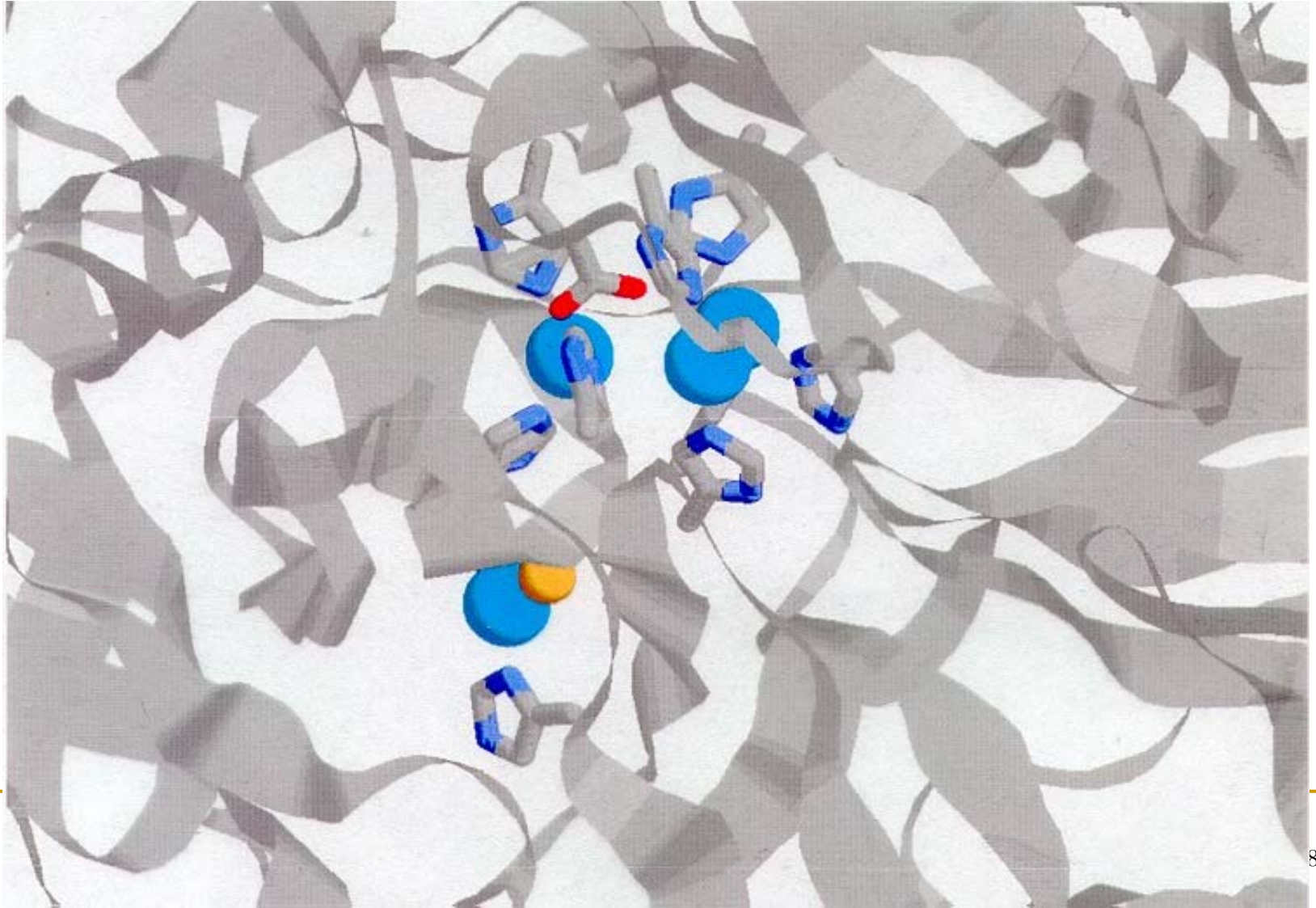
-
- Catalytical sites are the same

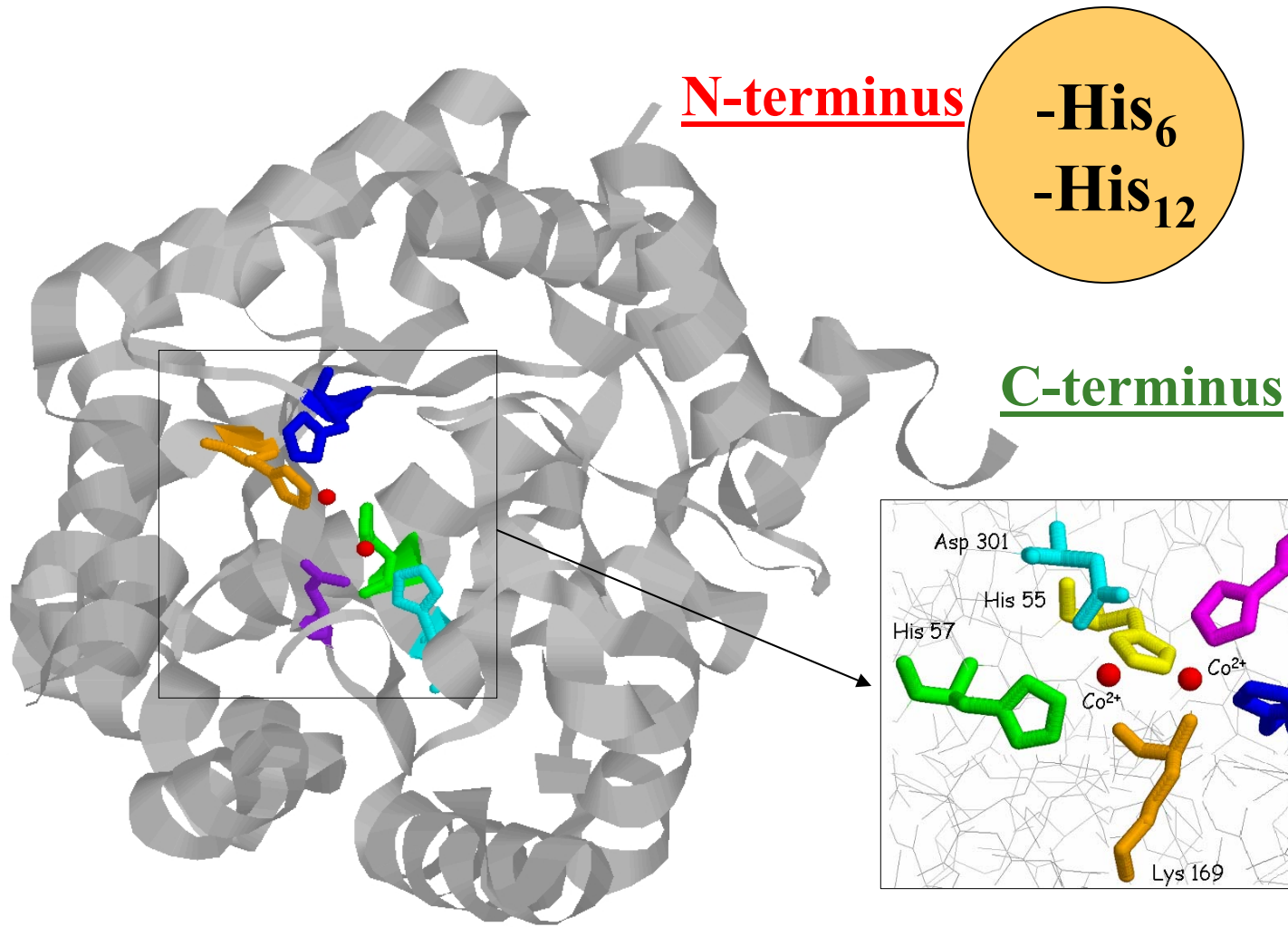
Streptogrisin and Subtilysin

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



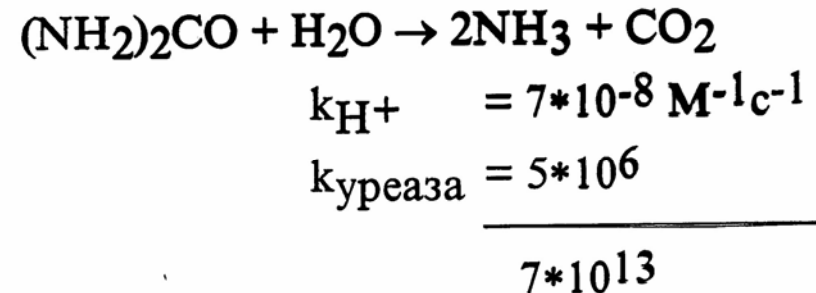
Active site of copper-containing oxidase



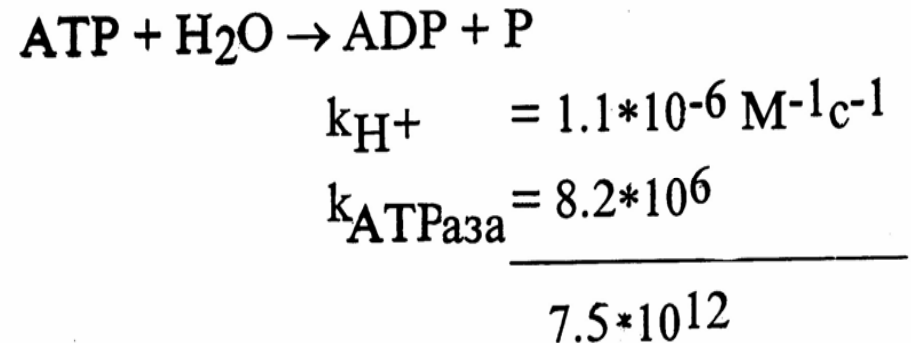


Ферменты – высокоактивные катализаторы

Гидролиз мочевины



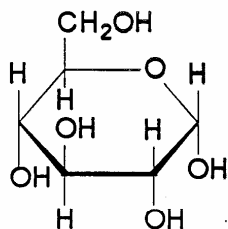
Гидролиз аденозинтрифосфата



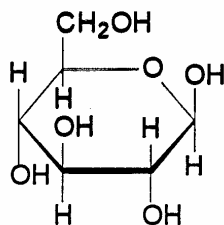
Ферментативная реакция - 1 секунда

Обычная каталитическая реакция – 200000 лет

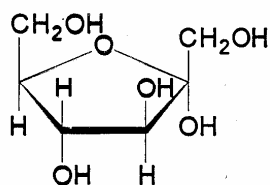
Ферменты – высокоselectивные катализаторы



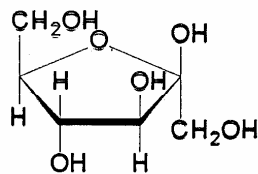
α -D-Глюкопираноза



β -D-Глюкопираноза



α -D-Фруктофураноза



β -D-Фруктофураноза

ГЛЮКОЗОКСИДАЗА



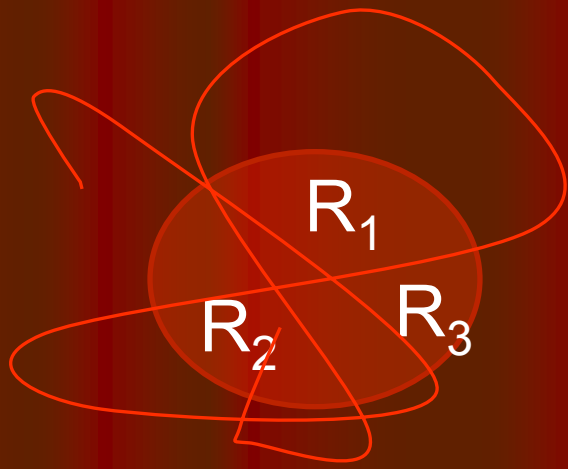
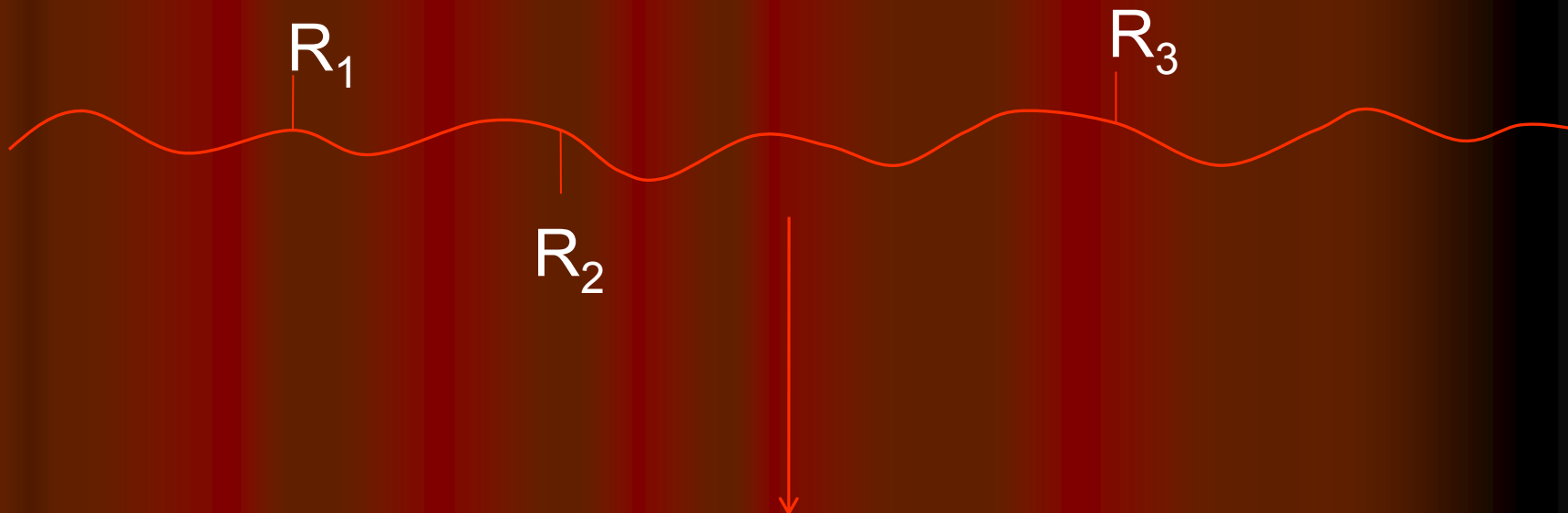
Активный центр

катализатора-продукт

формирования белковой

наночастицы из линейной

полимерной цепи





Химическая энзимология



Активный центр фермента

Два
подцентра

Комплекс
образующий
(селектирующий)
центр

Каталитический
(активирующий
молекулы) центр

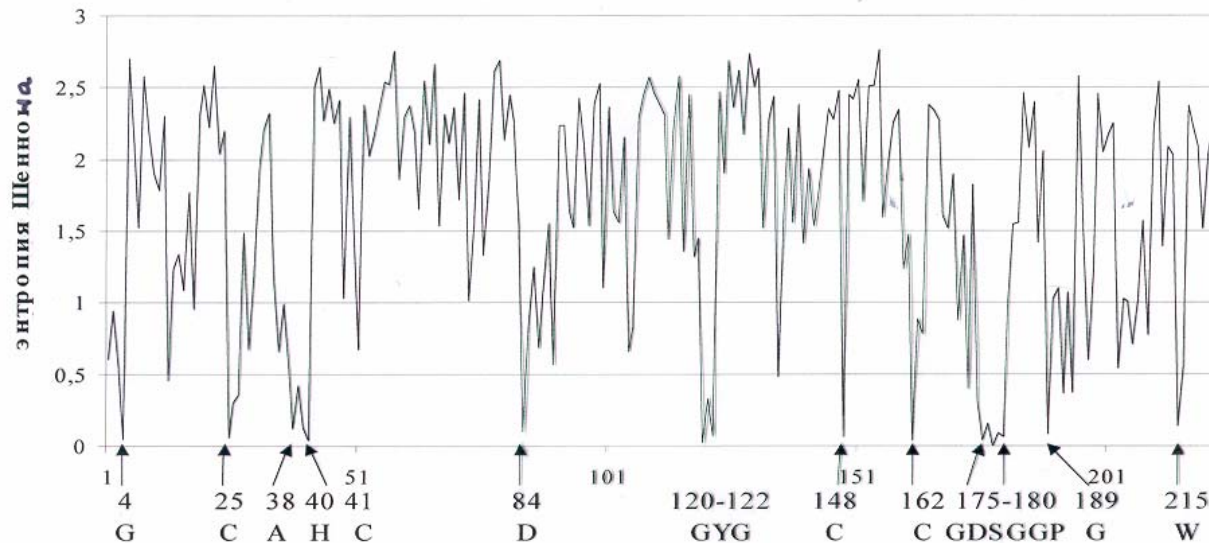


Идентификация каталитического центра

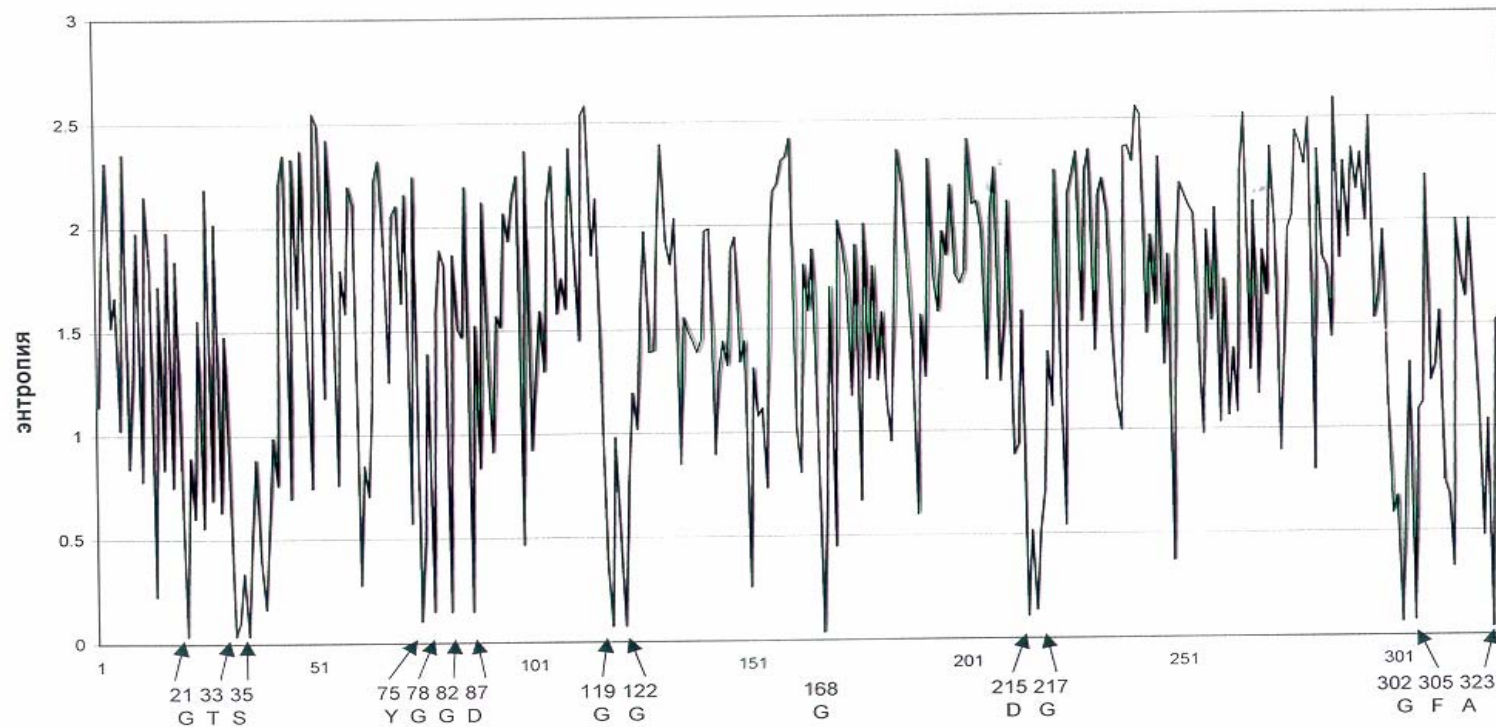
Компьютерное сравнение

- Первичных последовательностей аминокислот
- Трёхмерных структур

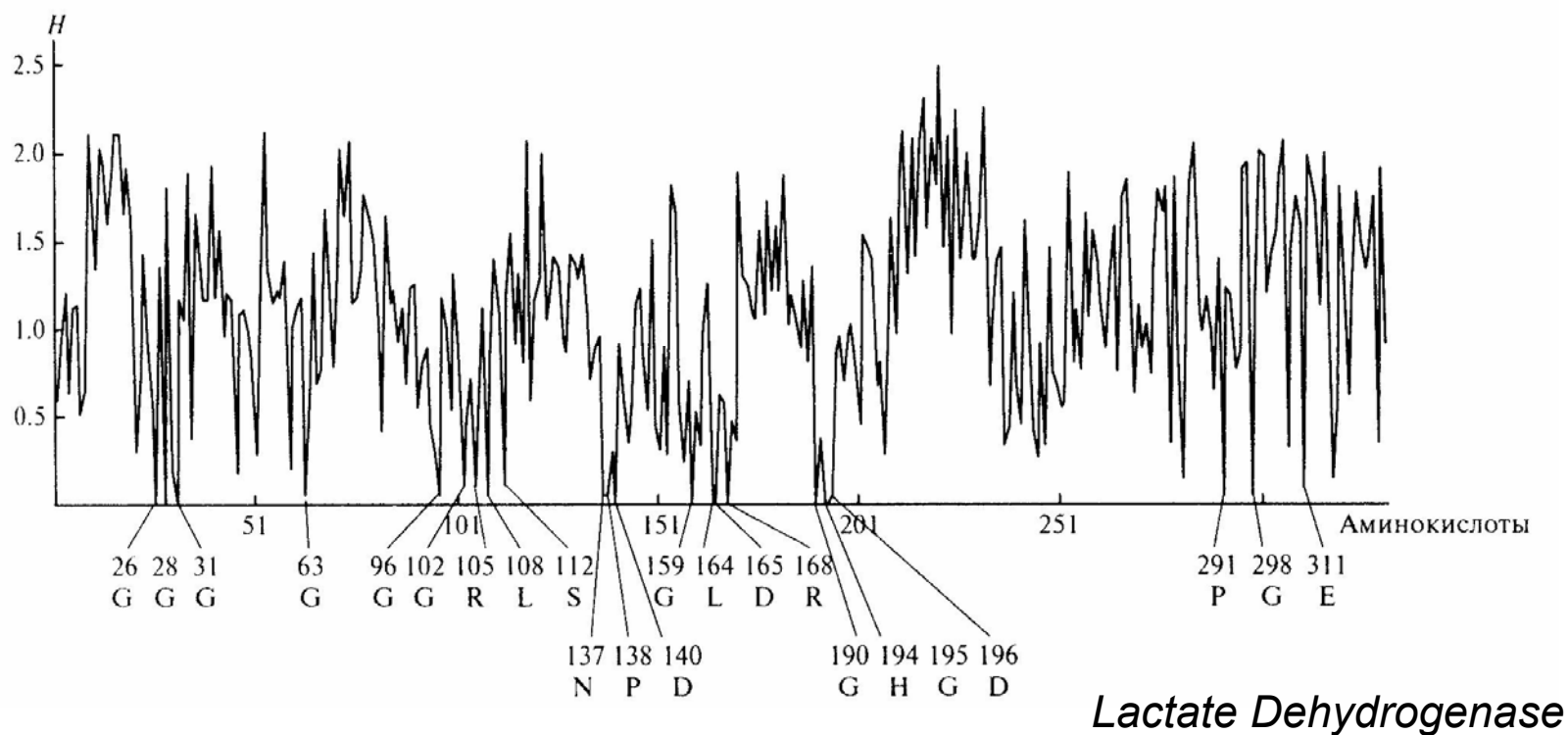
Информационные технологии в исследовании ферментов



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

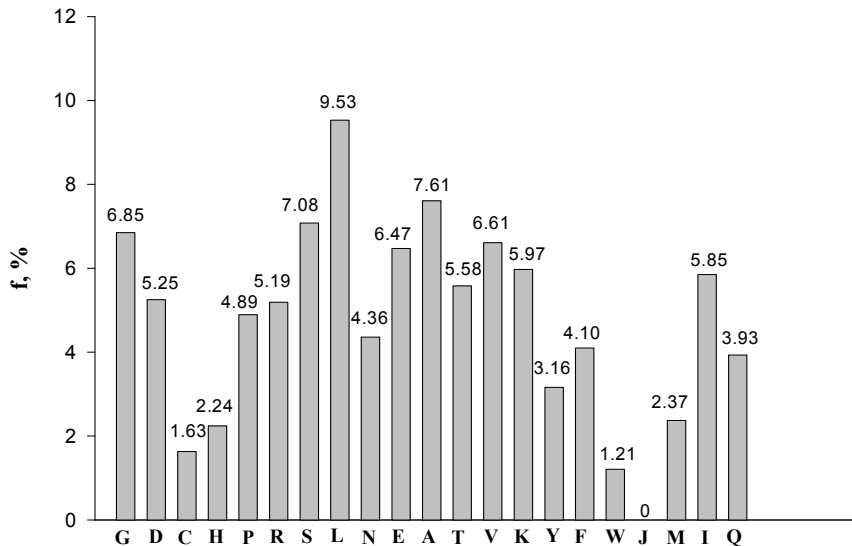
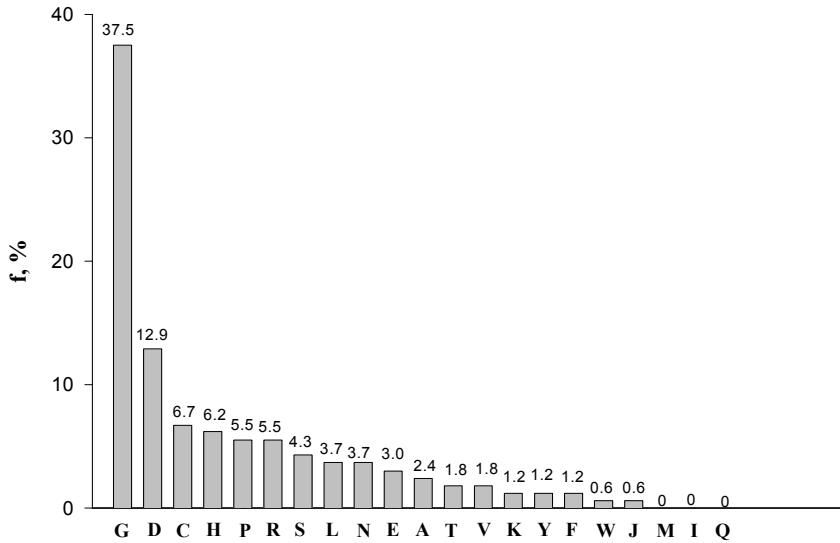


- Большая доля аминокислот в полипептидной цепи родственных ферментов (80-90) высоко вариабельна ($H > 2$)
- Существуют несколько позиций являющихся консервативными ($H \sim 0$)



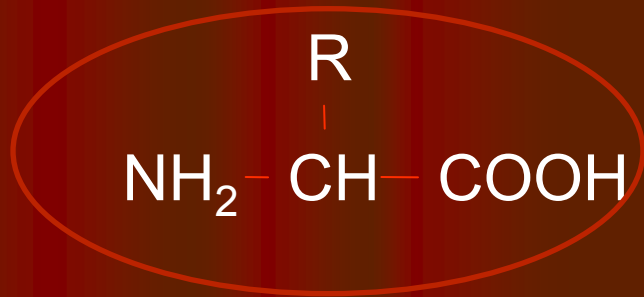
- *Аминокислоты, формирующие активный центр фермента, всегда проявляют себя как консервативные*

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

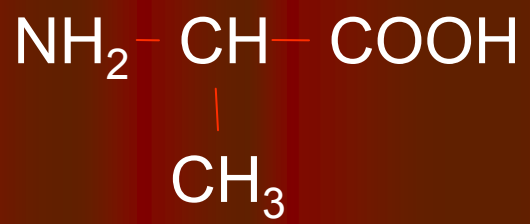


НОКИСЛОТЫ

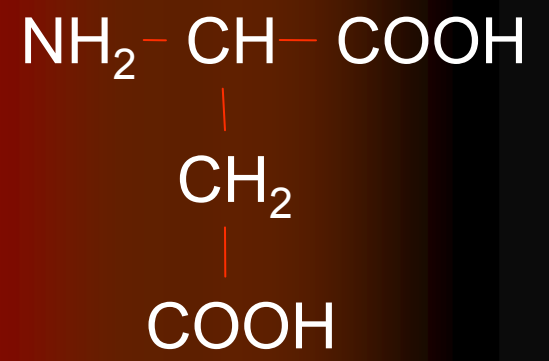
- Рейтинг консервативных аминокислот
- **Глицин-наиболее важная аминокислота в структуре ферментов**
- **Аспарагиновая кислота**
- **Гистидин**
- **Аргинин**



Глицин

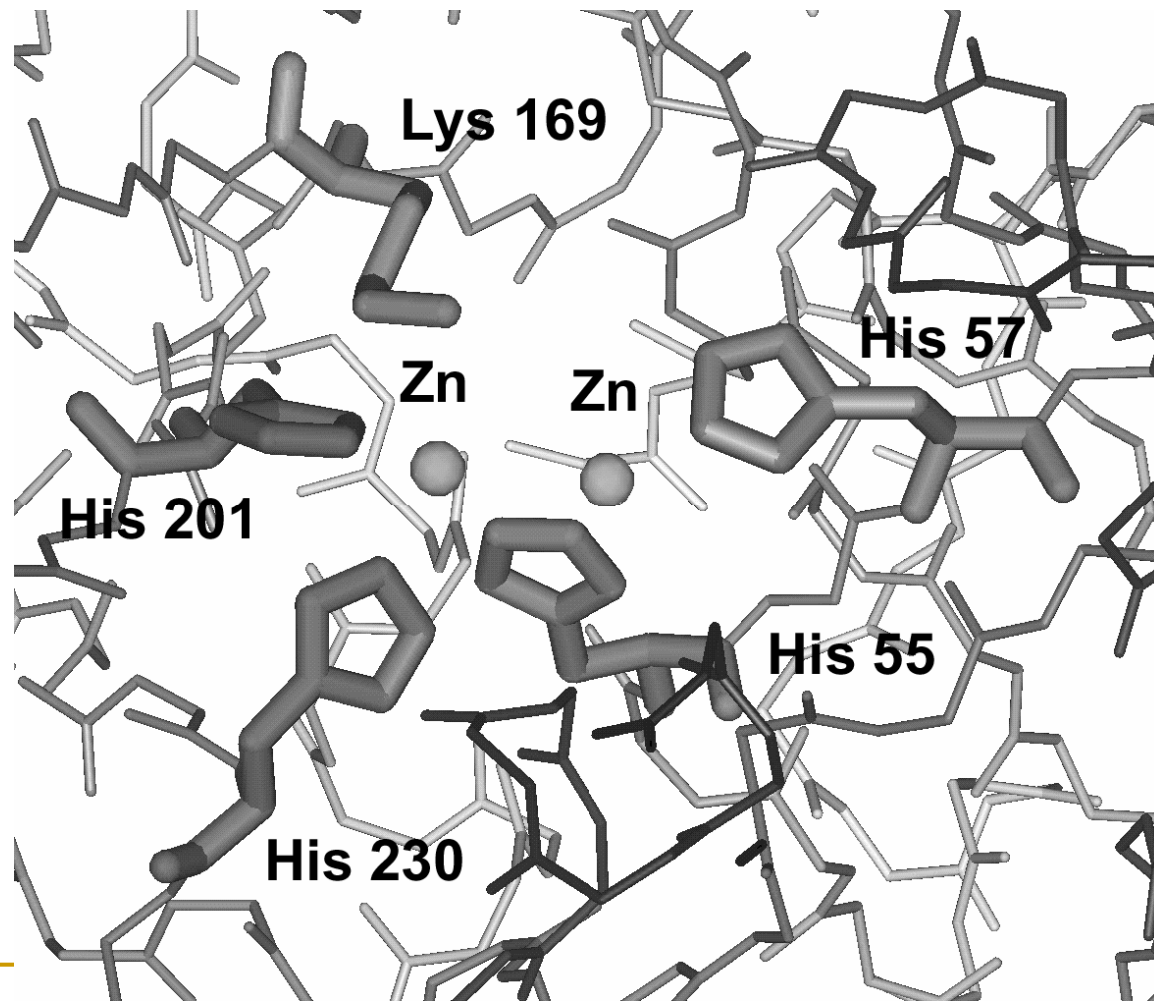


Аланин



Аспарагиновая
кислота

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



Консервативные

глицины-

принципиально важные

точки при

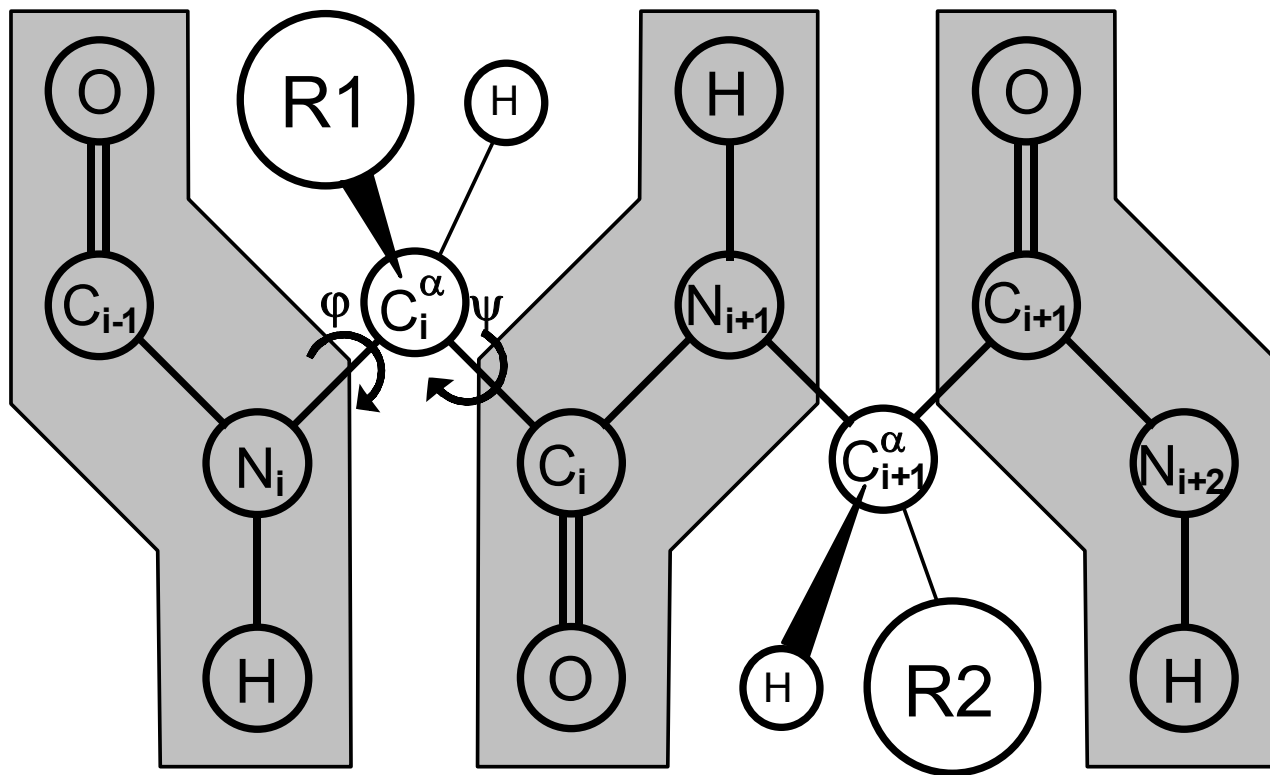
формировании

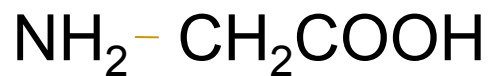
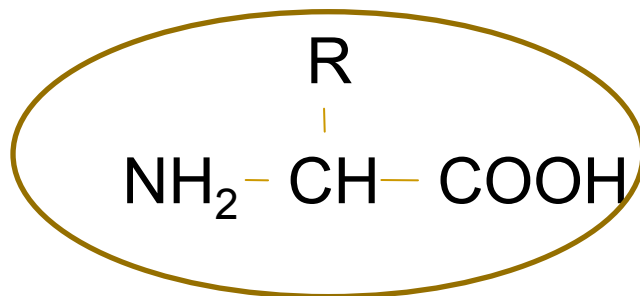
пространственной

структуры белковой

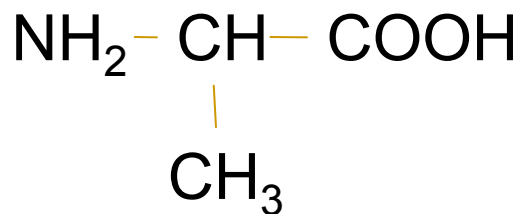
наночастицы и

активного центра

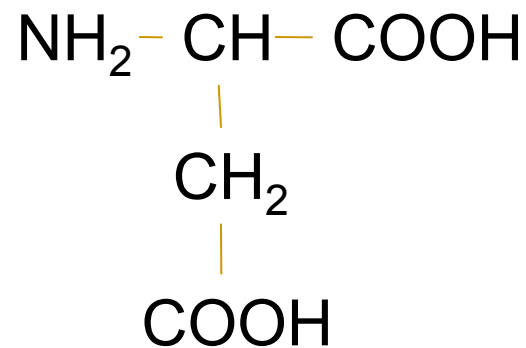




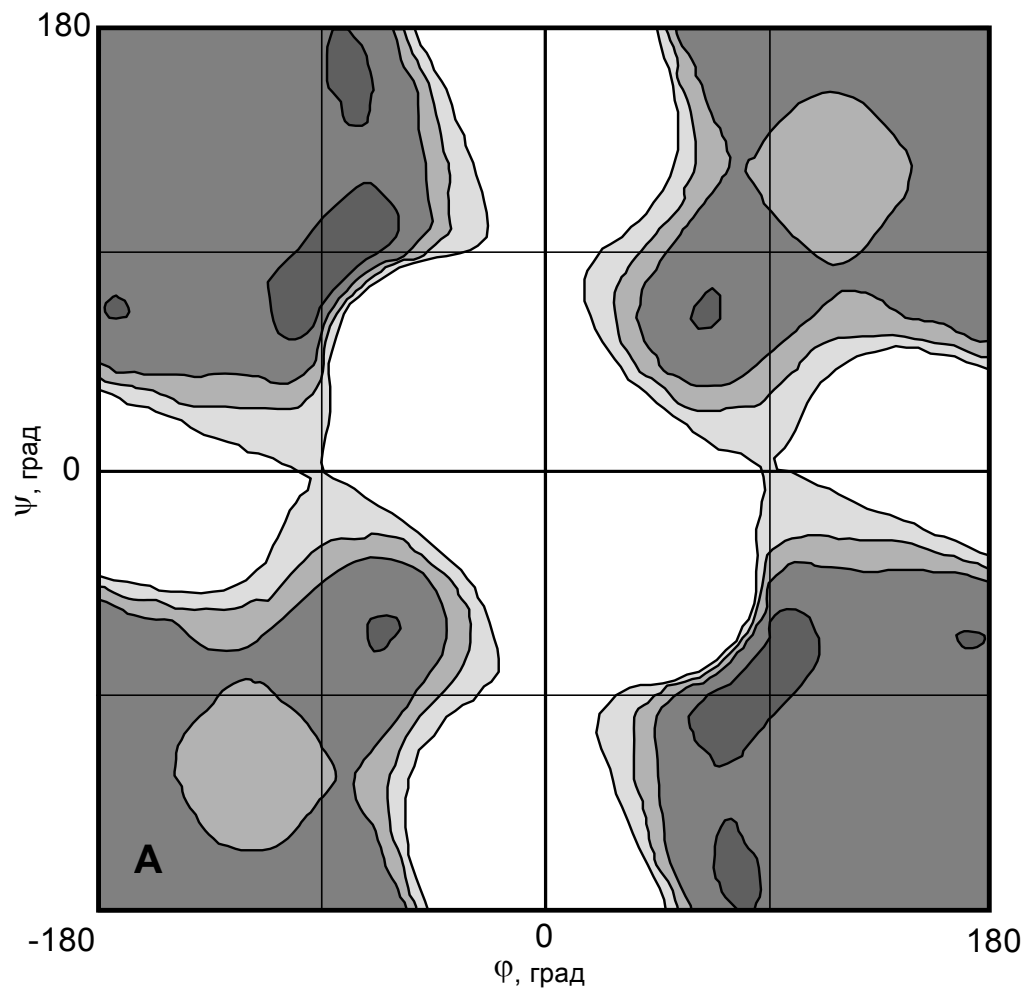
Глицин

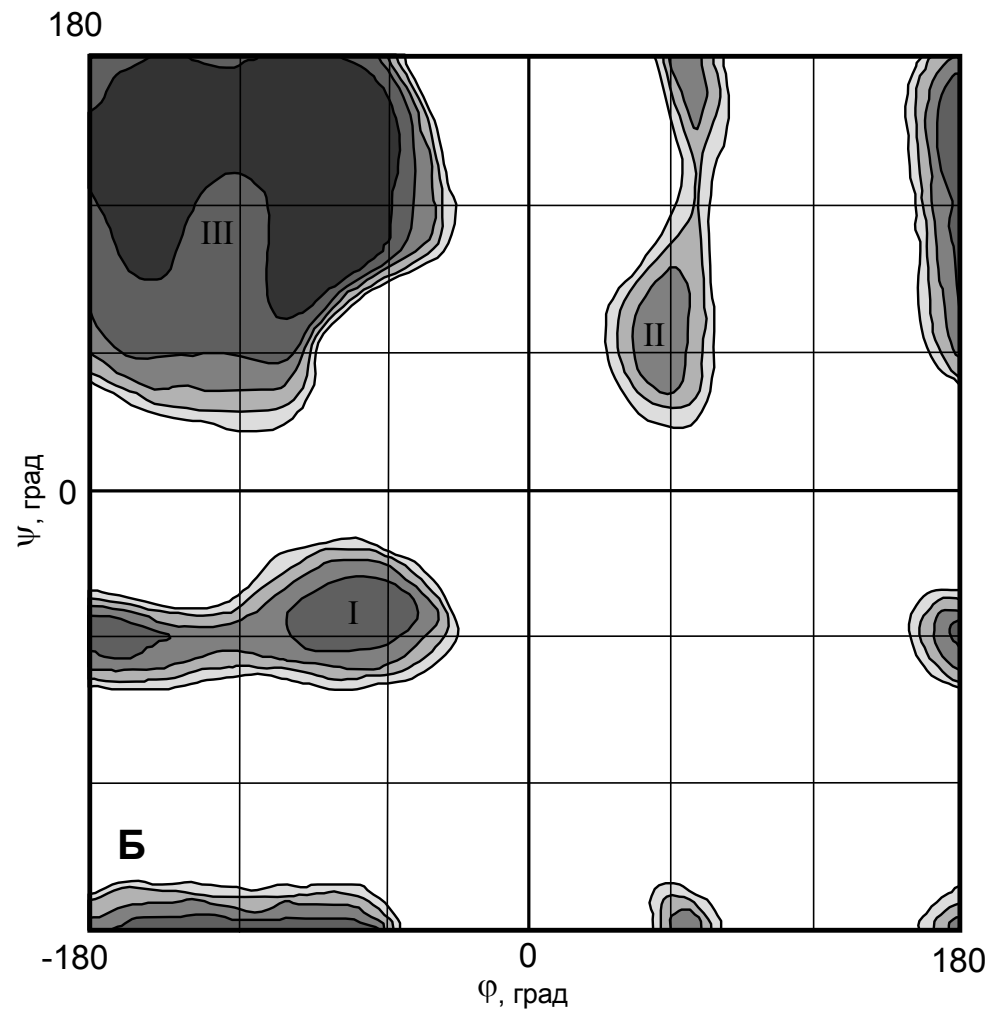


Аланин



Аспарагиновая
кислота



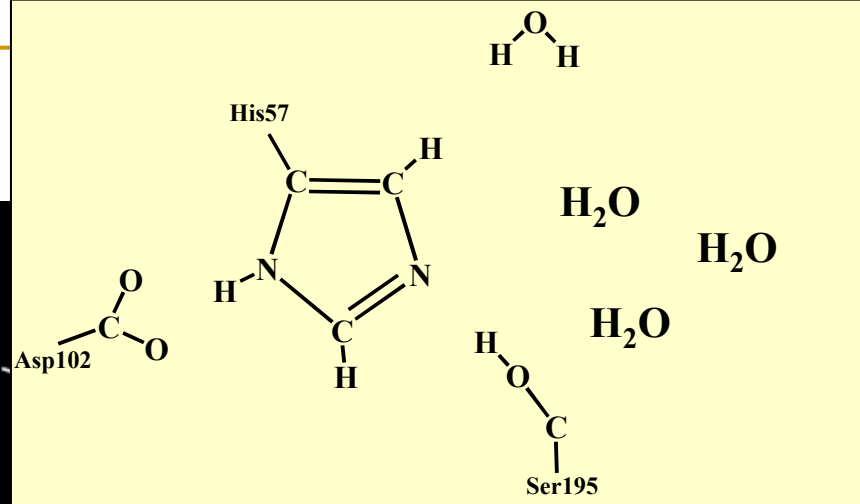
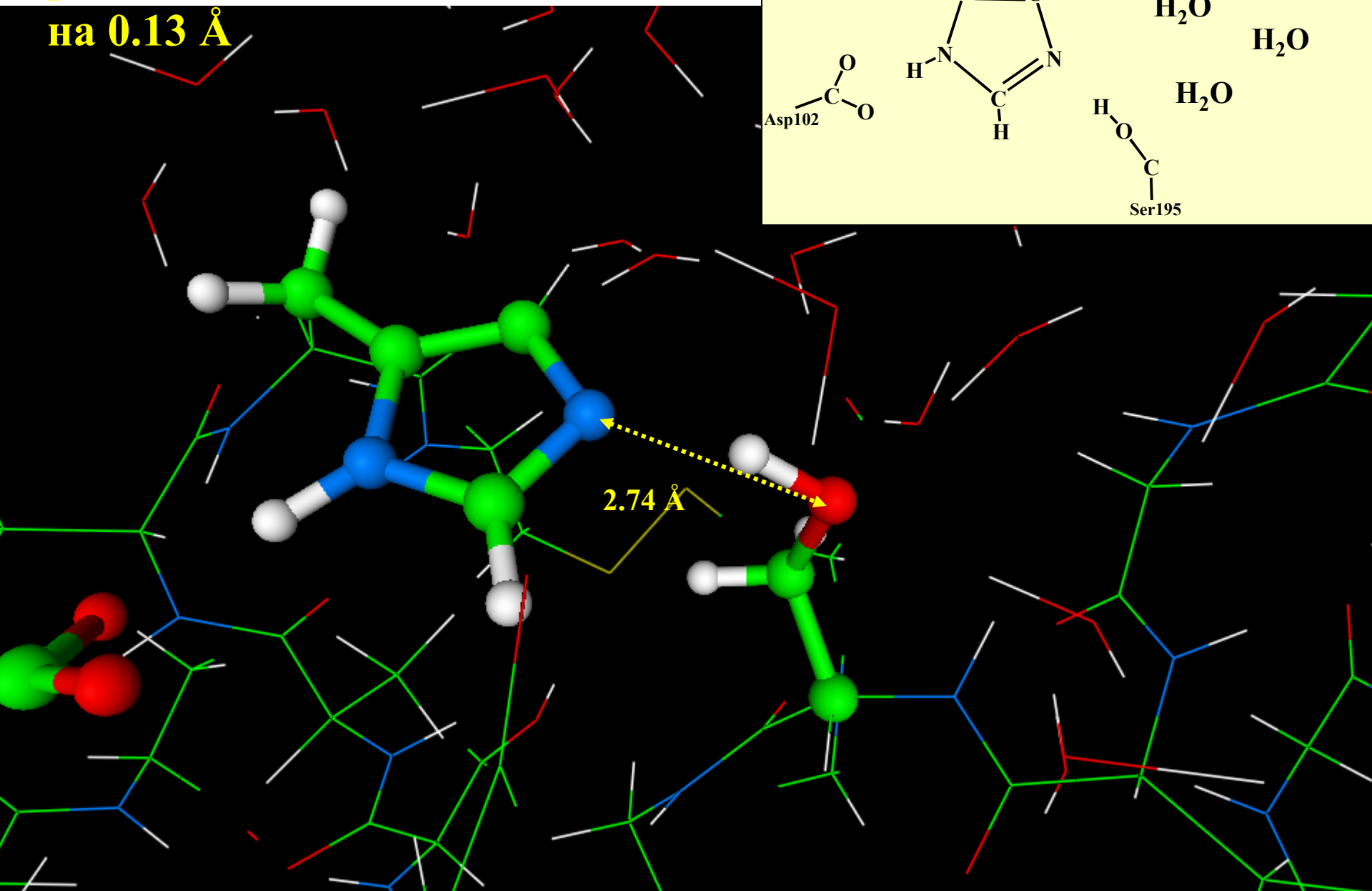


Катализ белковыми
наночастицами-согласованное
взаимодействие кислот и
оснований

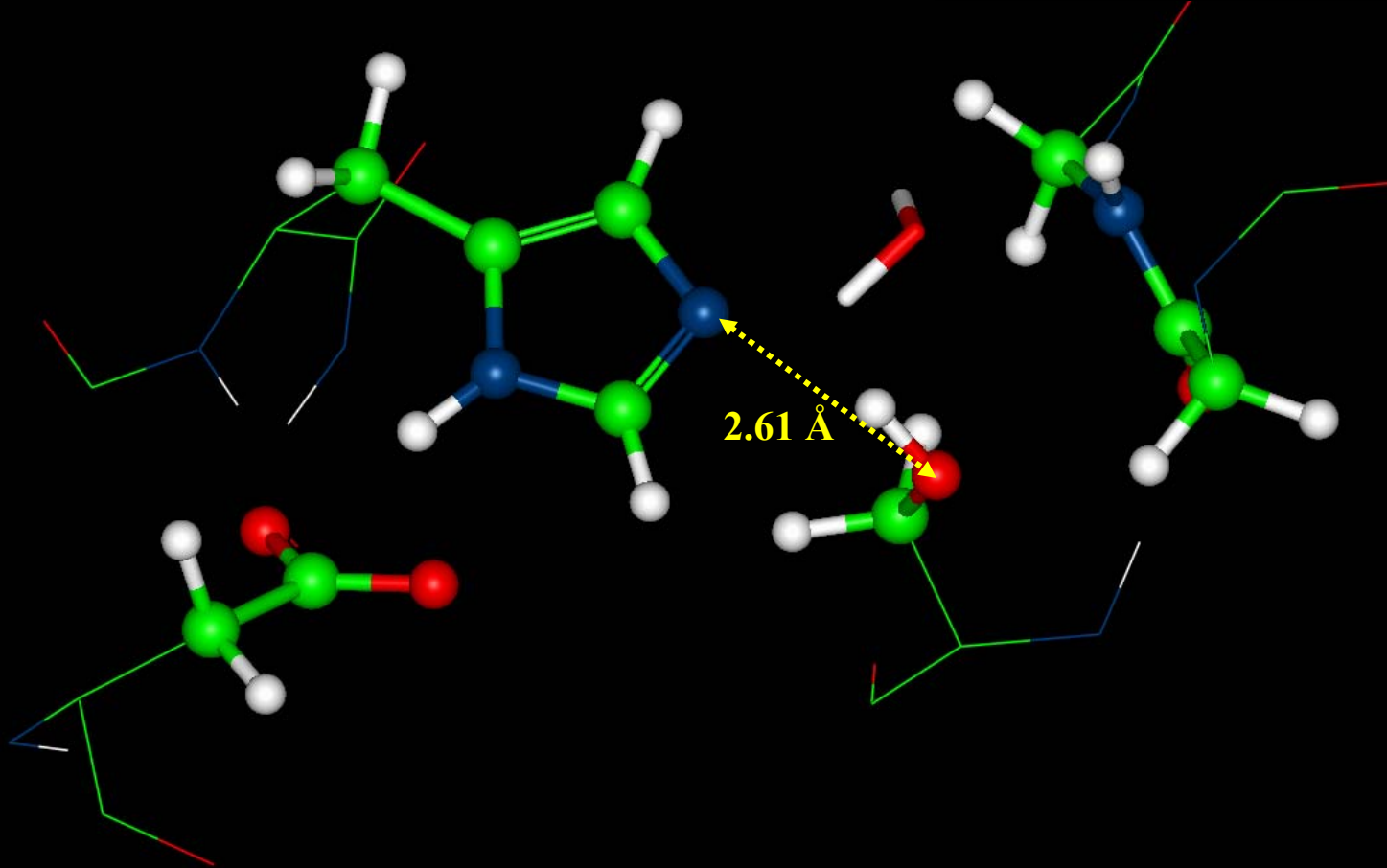
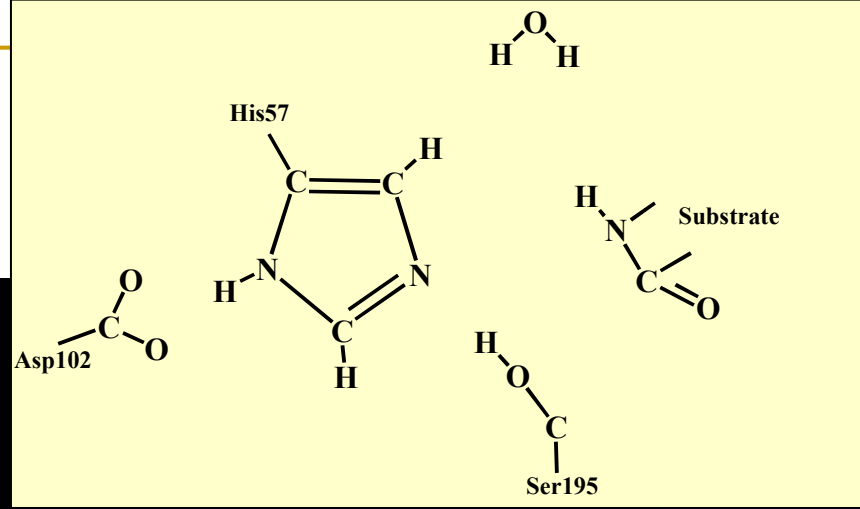
Квантовая химия в исследовании элементарных актов белкового катализа

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

Фермент без субстрата:
расстояние Ser-His длиннее
на 0.13 \AA



ES комплекс



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

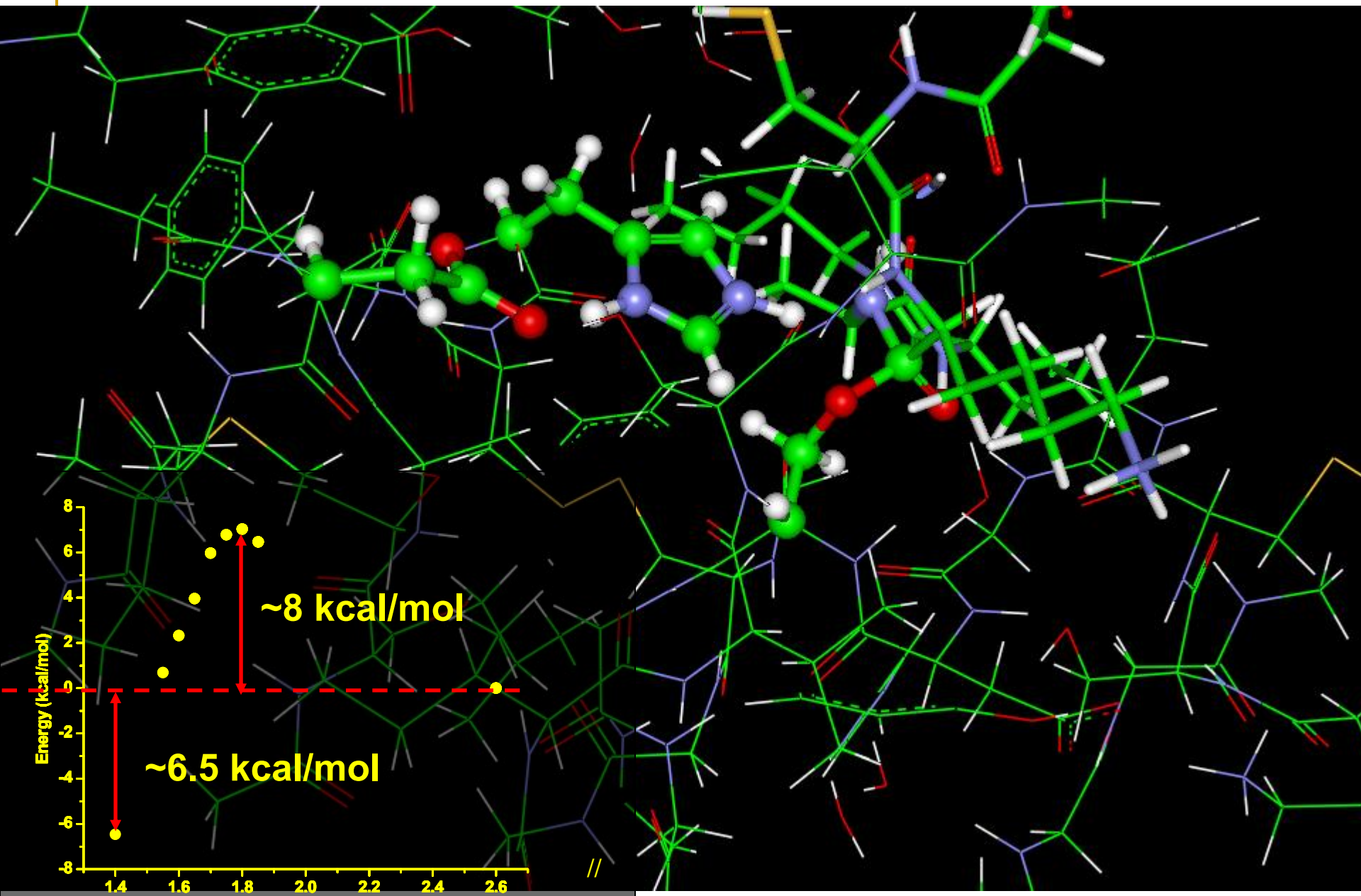


QM/MM даёт $\Delta E \approx 3 \text{ kcal/mol}$

В соответствии с теорией переходного состояния

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

$$k_1/k_2=150$$

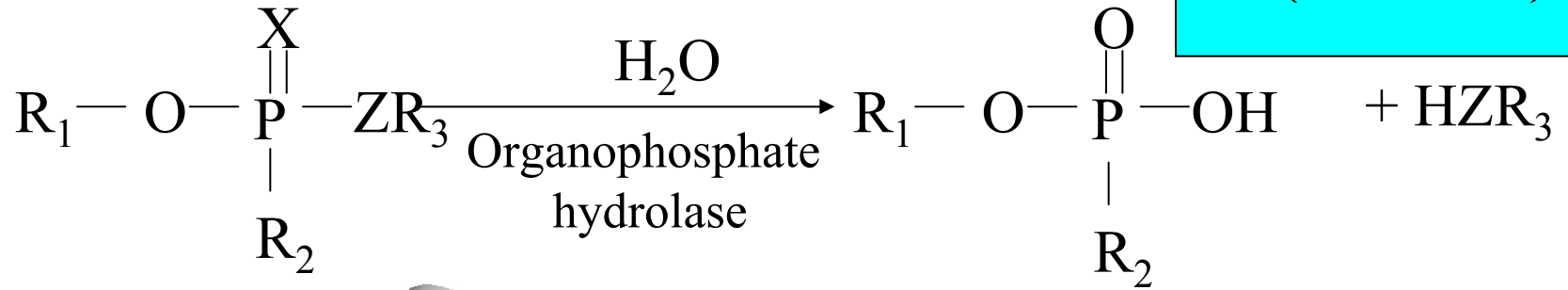


R(C-O), Å

Химическая и генетическая модификация ферментов- придание новых свойств

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

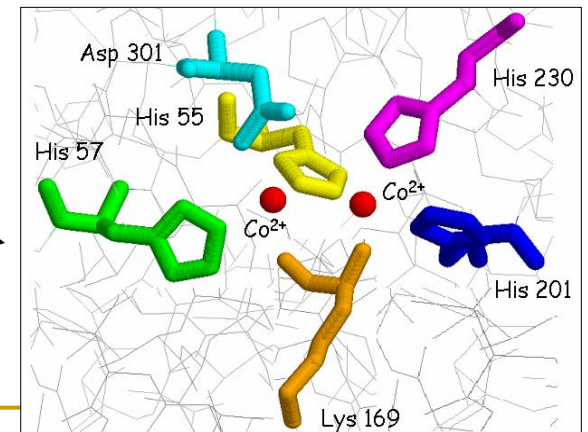
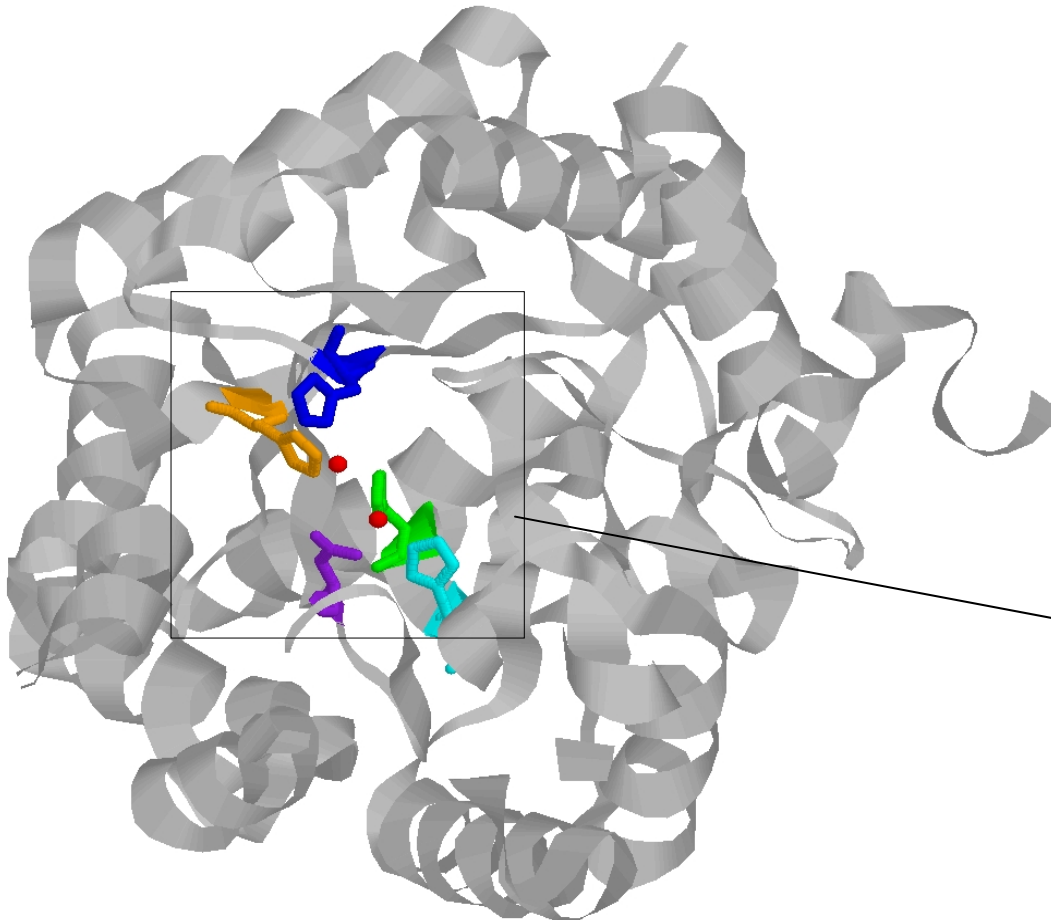
Organophosphate hydrolase (EC 3.1.8.1)

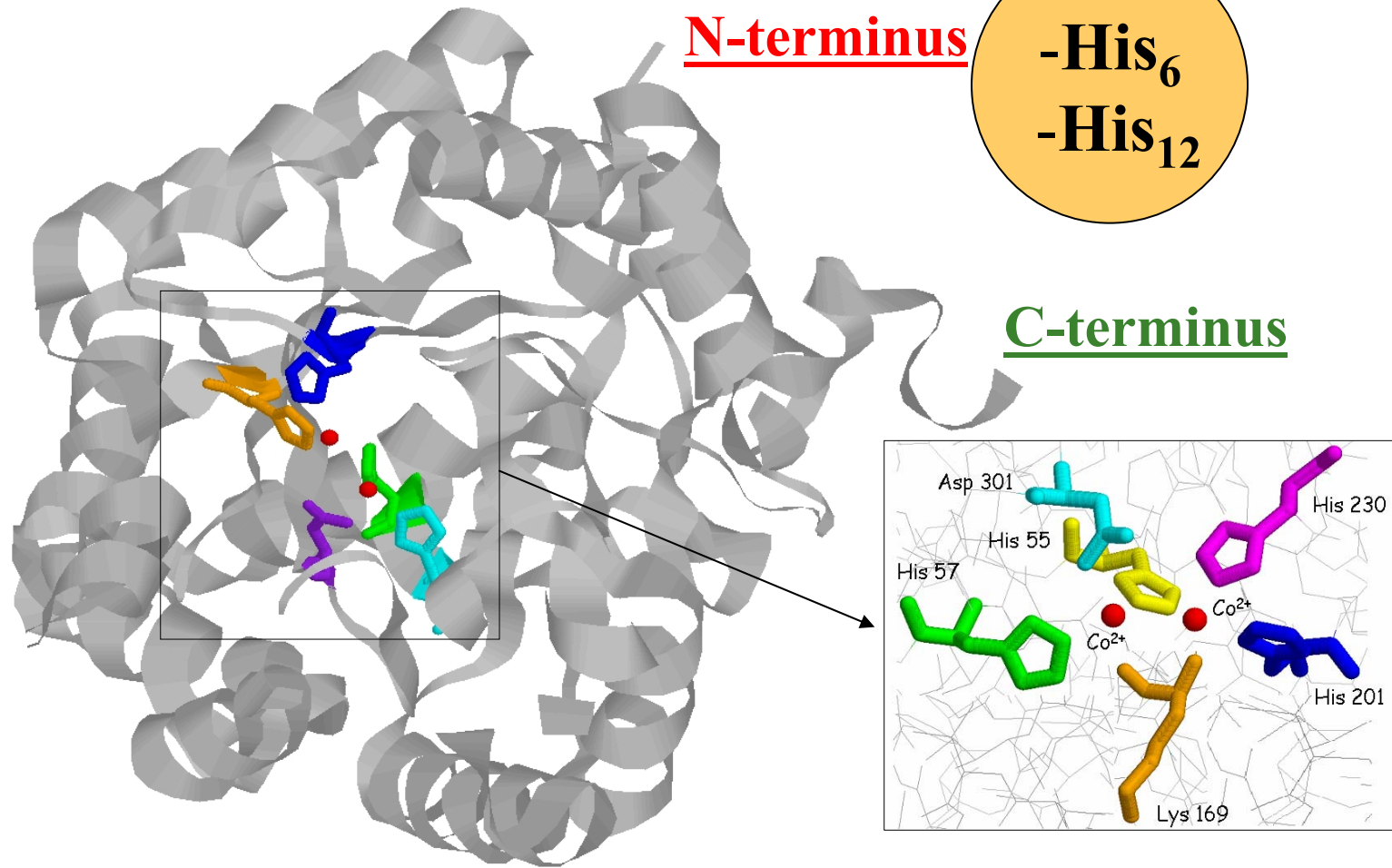


X = O, S

Z = O, S and F,

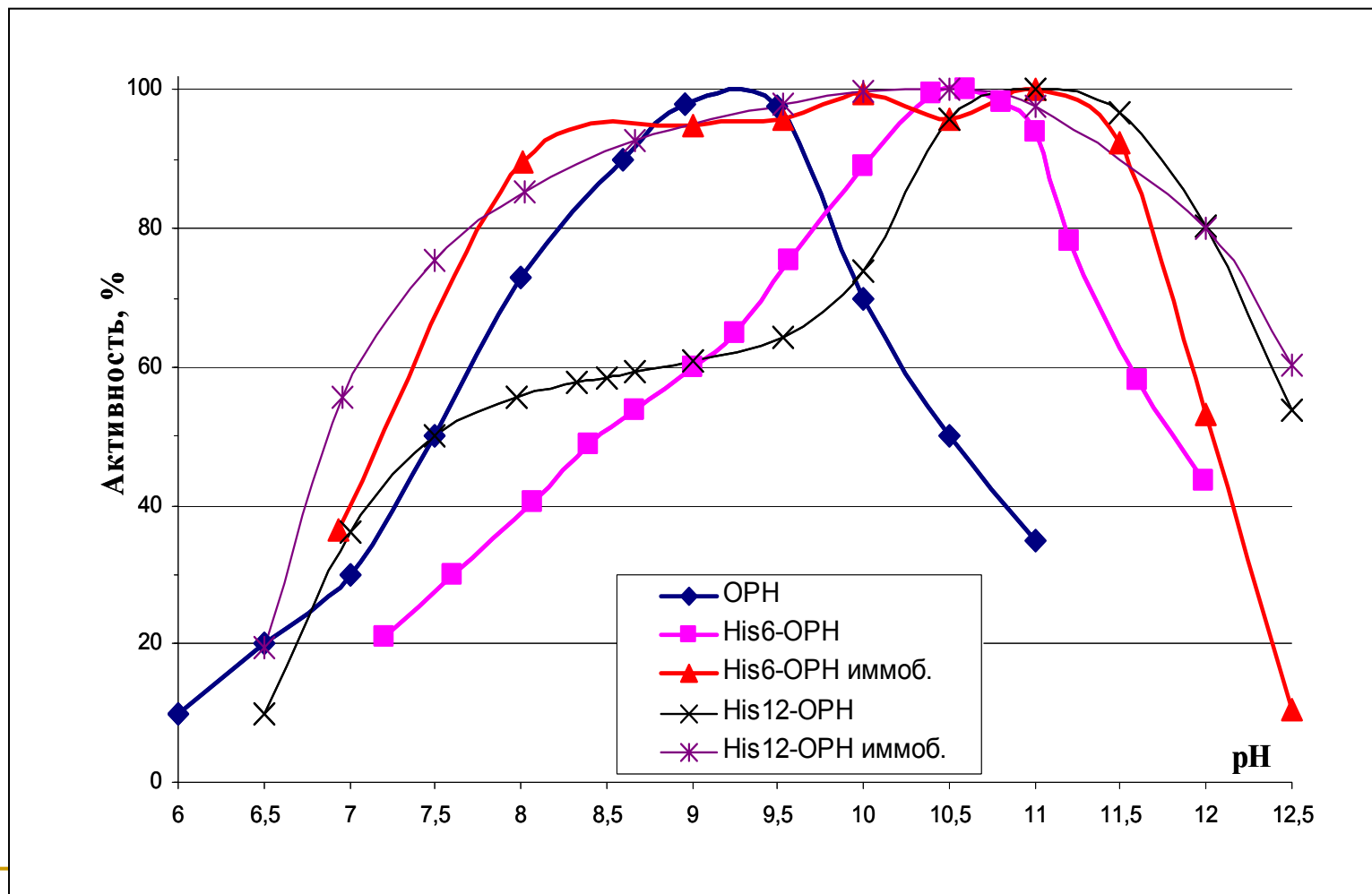
when R₃ is absent





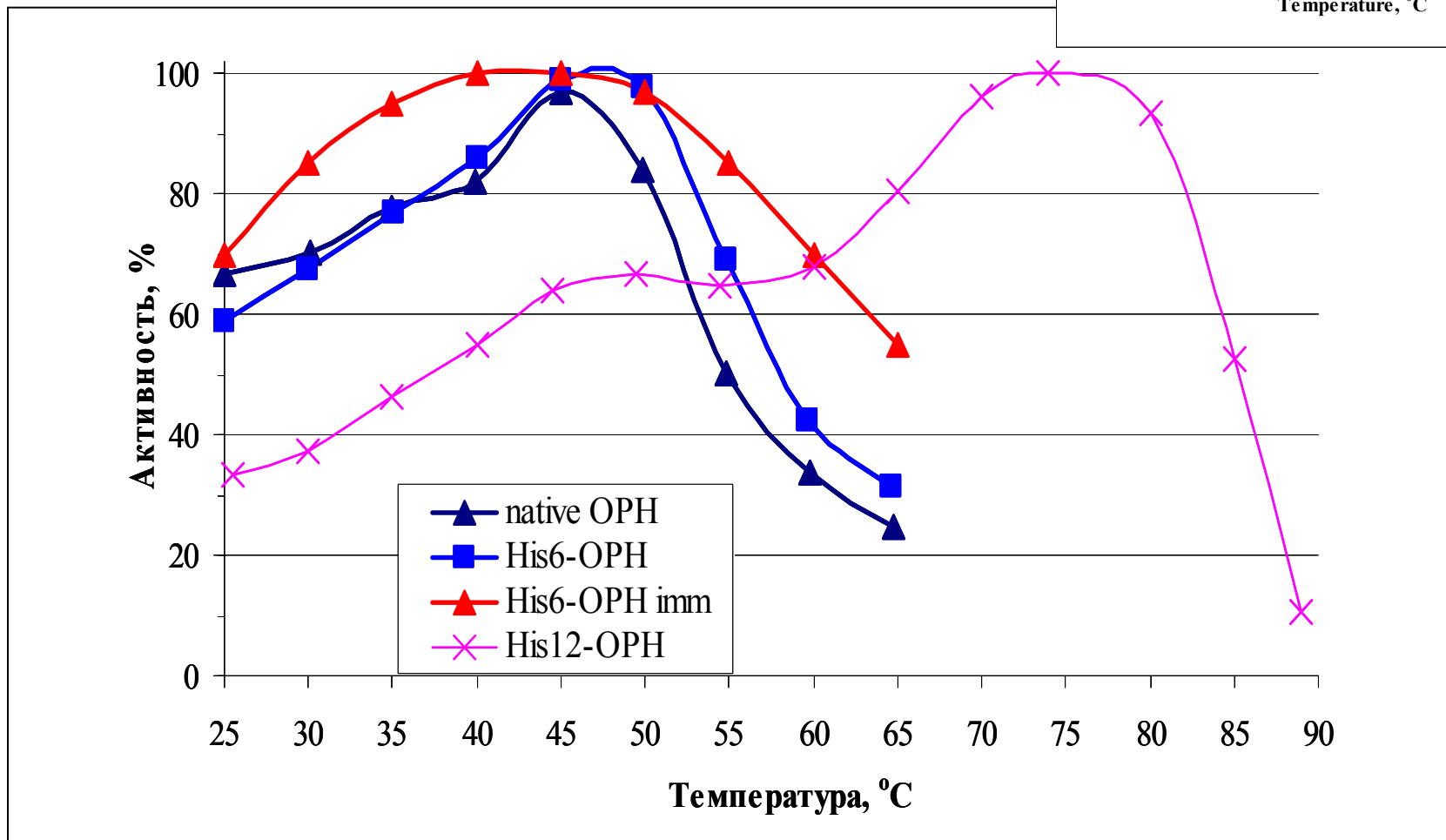
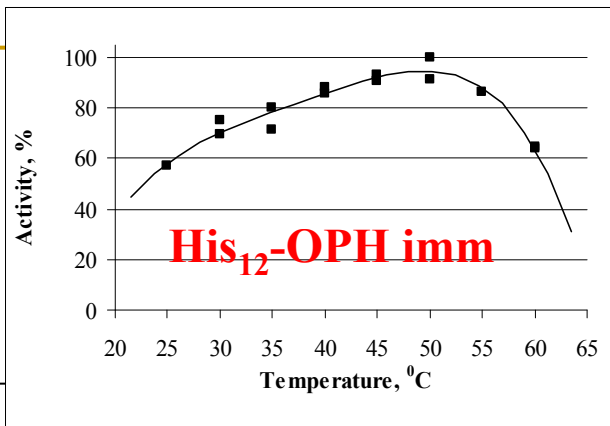
- Presence of affine tags in the protein structure
- Systems for highly efficient expression of proteins (plasmids and strains)
- Optimized conditions for high yield of enzyme synthesis in the soluble active form

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)



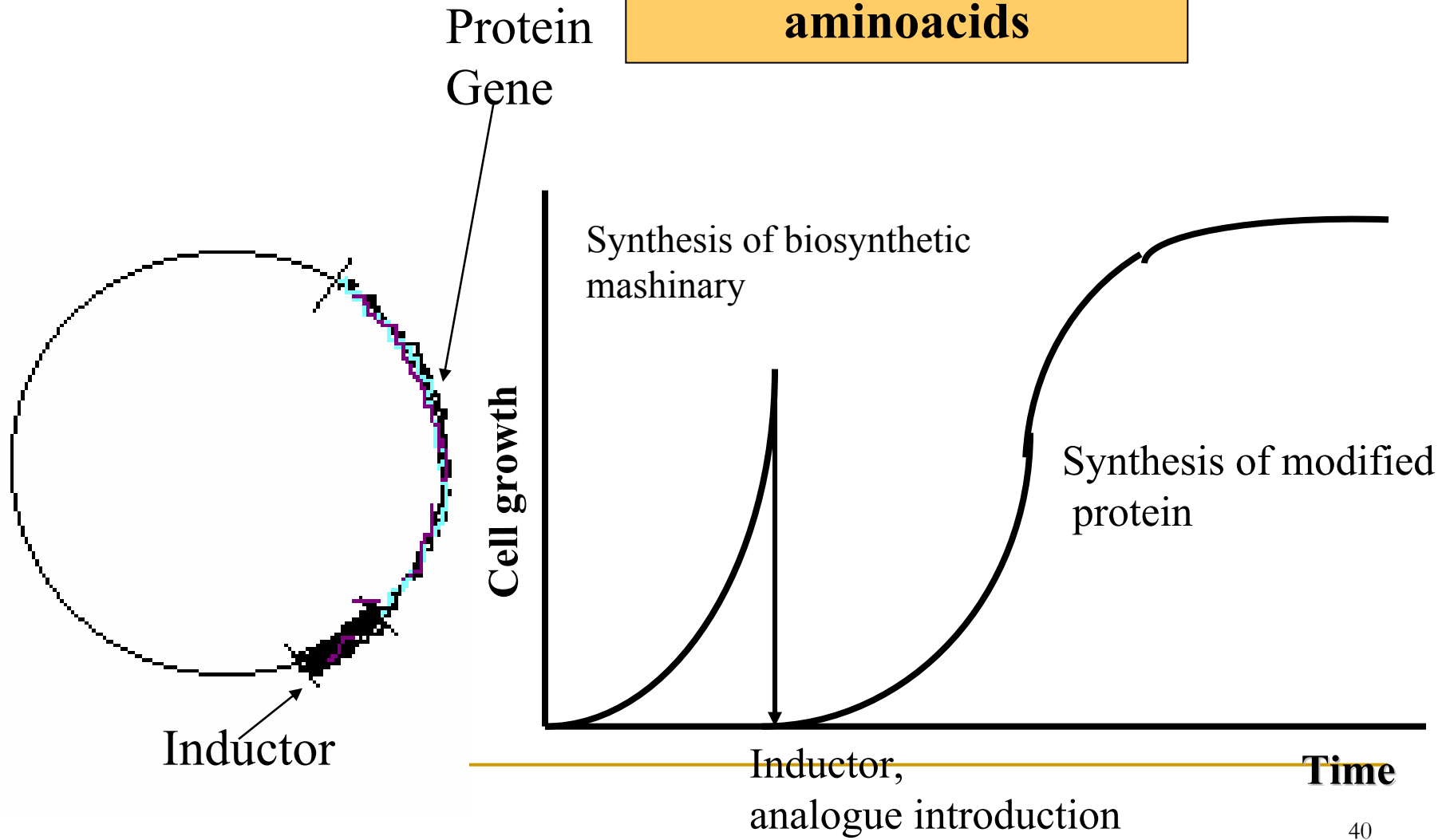
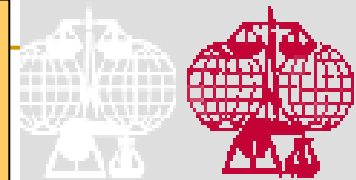
Conditions: pH 10.5; 2 mM Paraoxon, 50 mM buffers

Ферменты могут работать в
кипящей воде

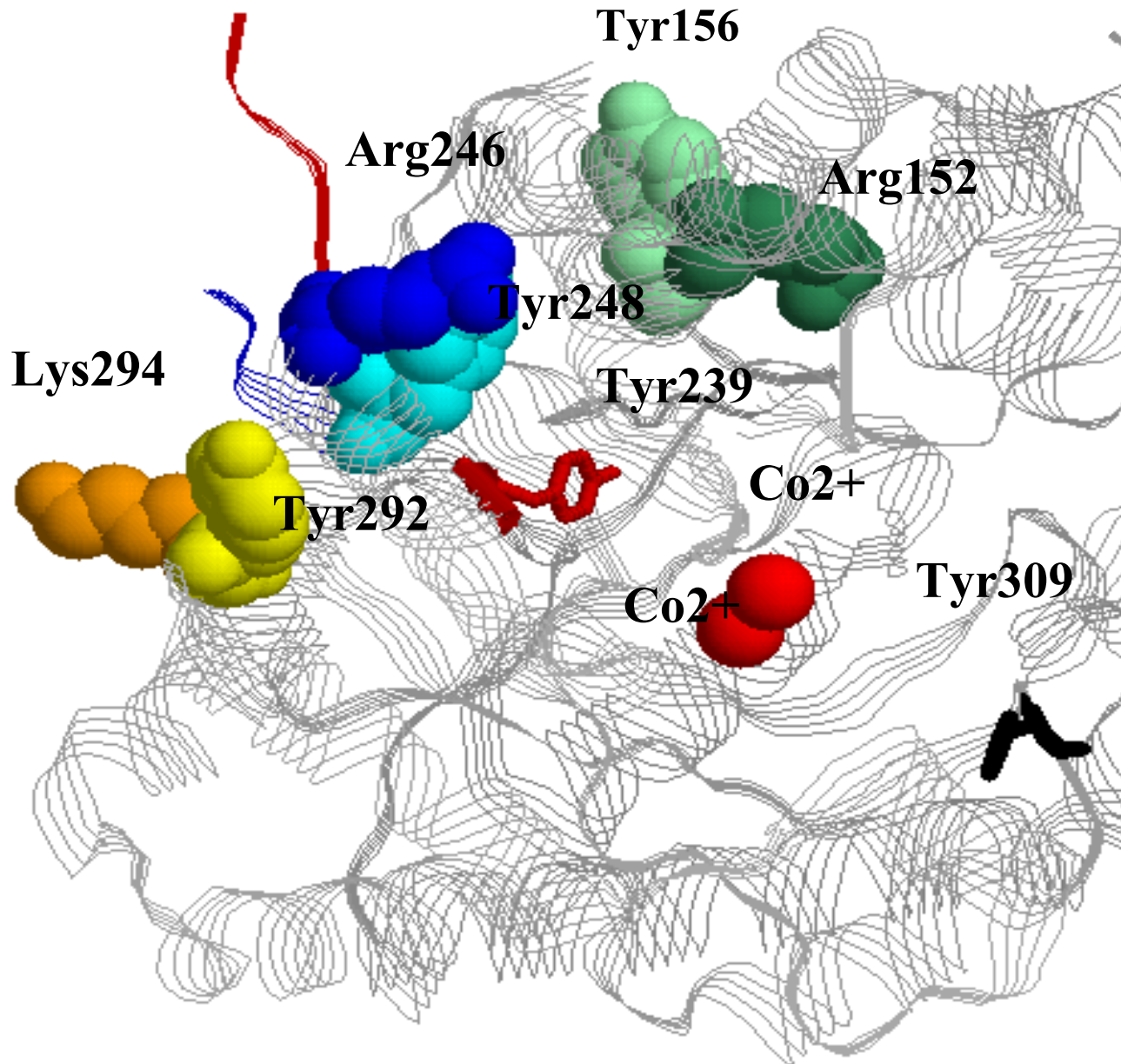




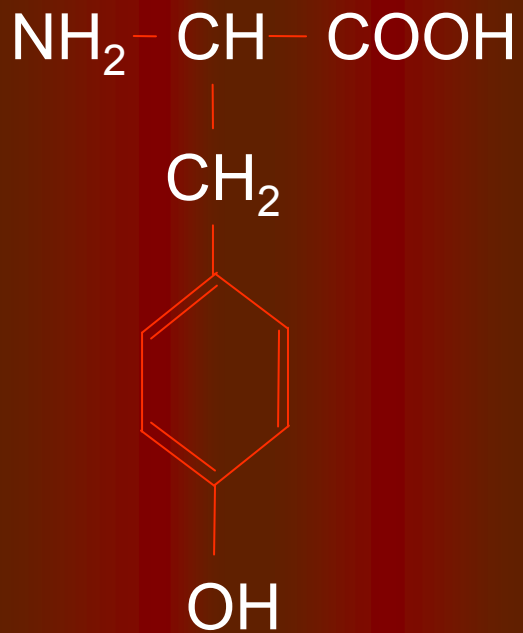
**Gene-expressed proteins
with
Organoelementary
aminoacids**



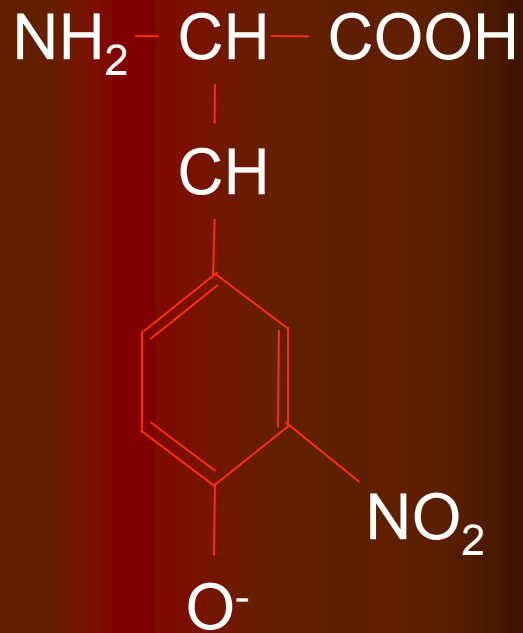
Tyrosine positions in OPH



Тирозин

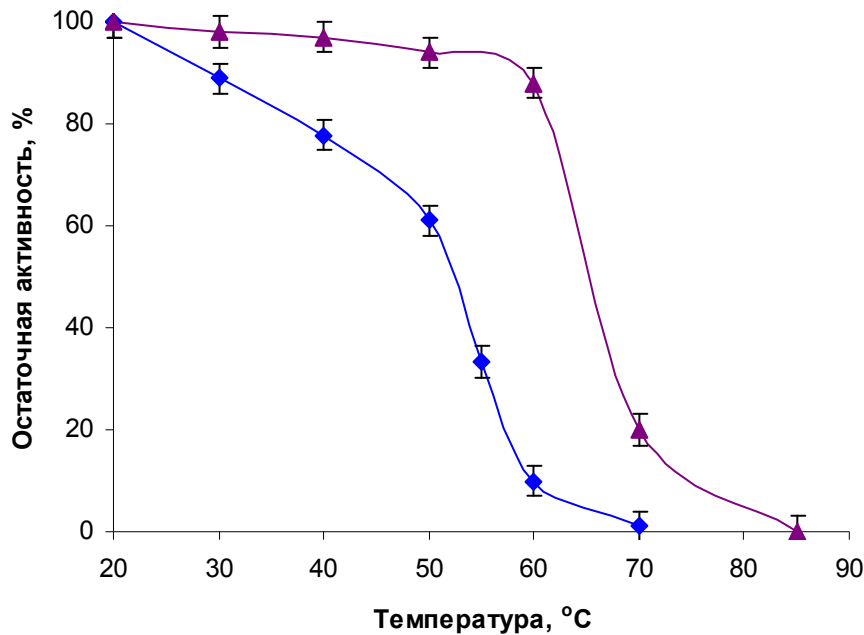
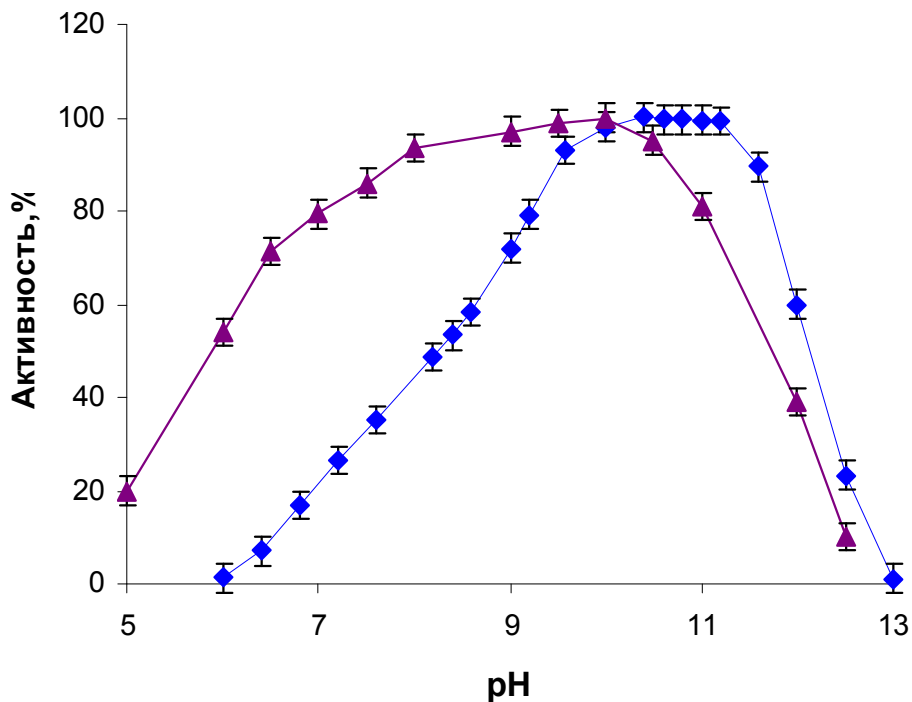


Нитротирозин



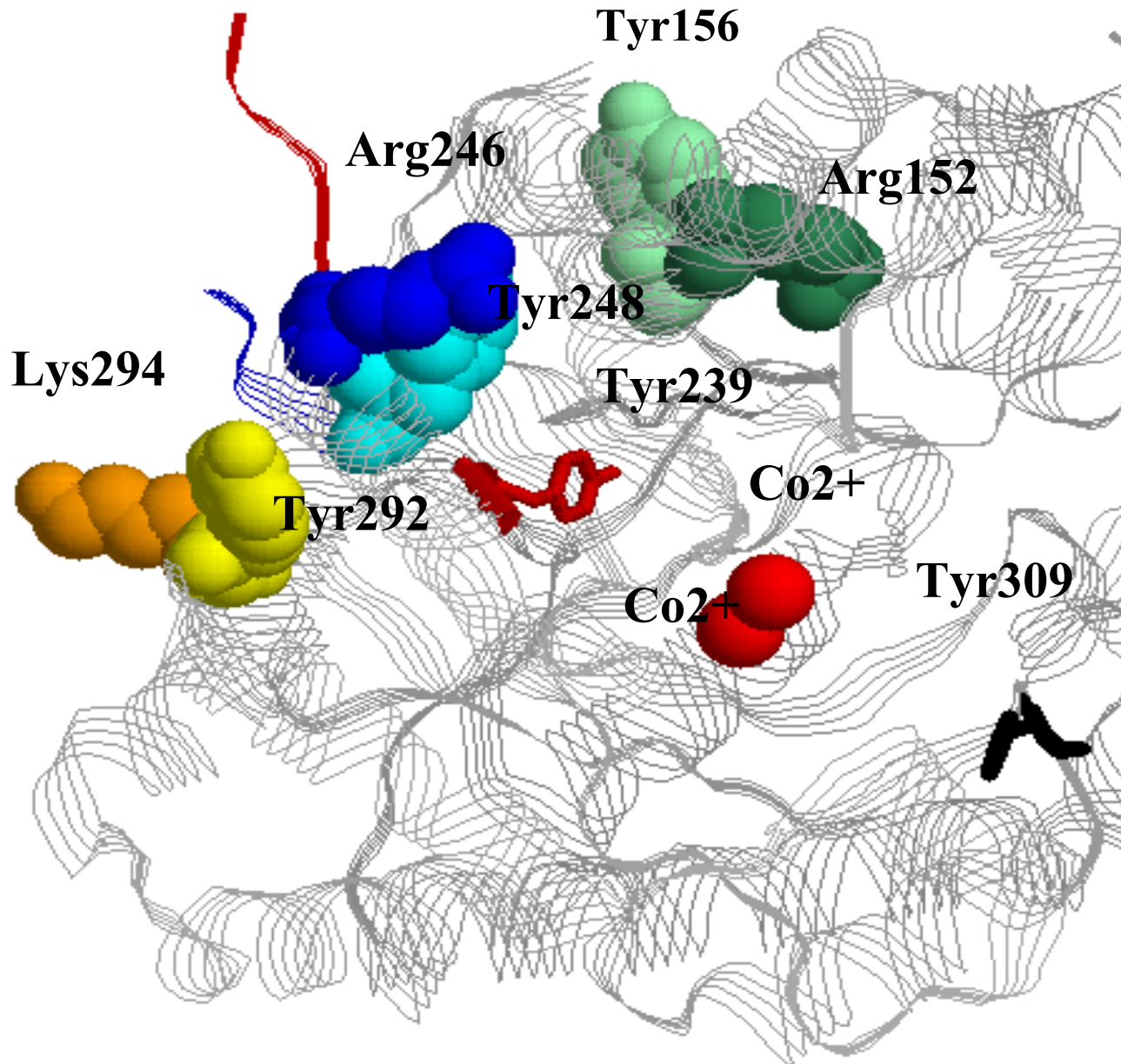
His₆-OPH и F-Tyr-His₆-OPH

Thermostability His₆-OPH и F-Tyr-His₆-OPH



Fluorine-OPH-thermostable enzyme

Tyrosine positions in OPH



Наноразмерные эффекты в белковом катализе

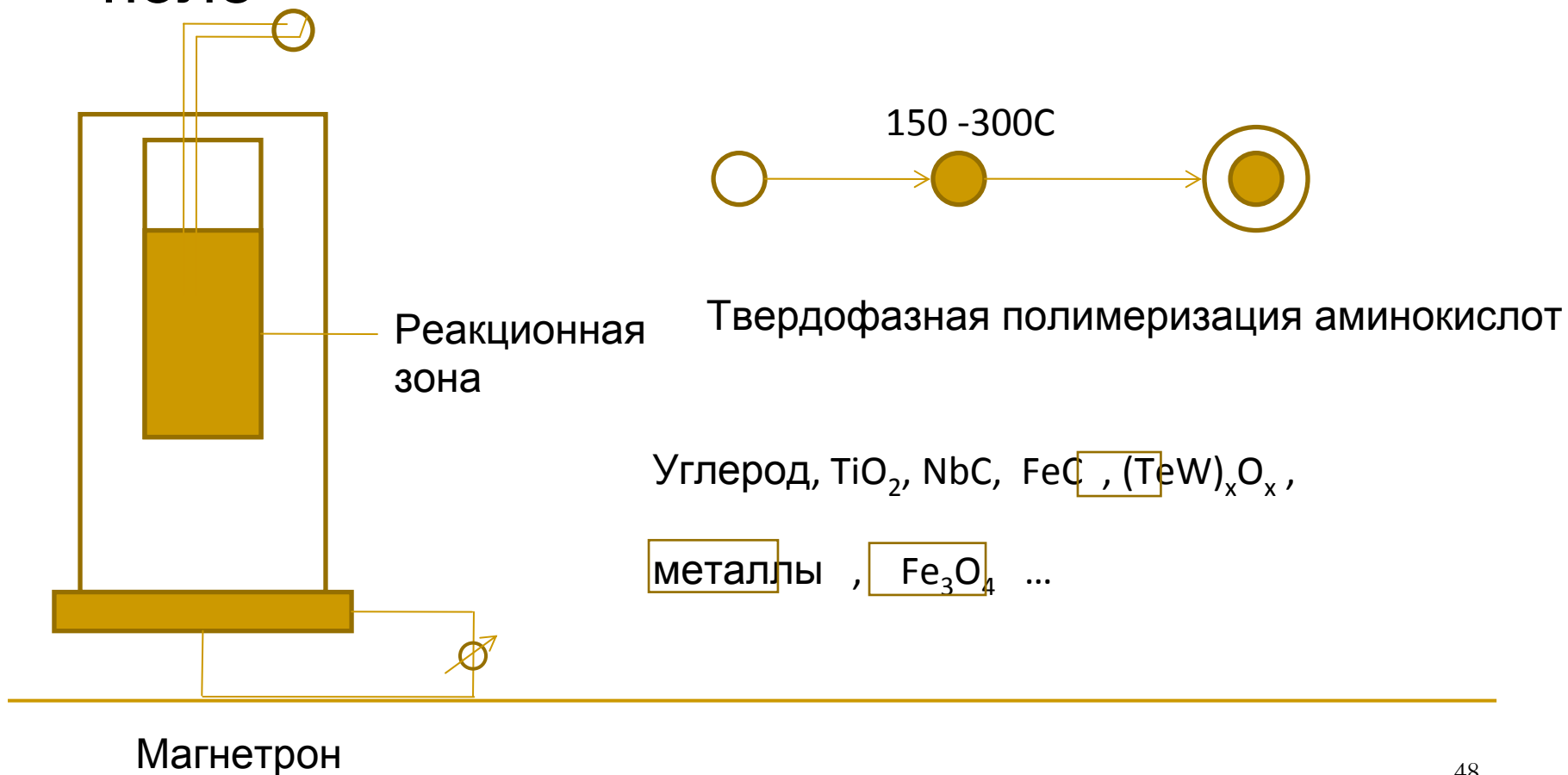
***Каталитическую активность можно
регулировать сжимая и расслабляя
белковую наночастицу в обращенных
мицеллах, Н.Л.Клячко***

Нанозимы-
ферментоподобные
катализаторы, полипептиды,
иммобилизованные на
наночастицах

Активируемые
микроволновым
излучением
магнитоуправляемые
ферментоподобные
катализаторы

Ферментоподобные нанокатализаторы

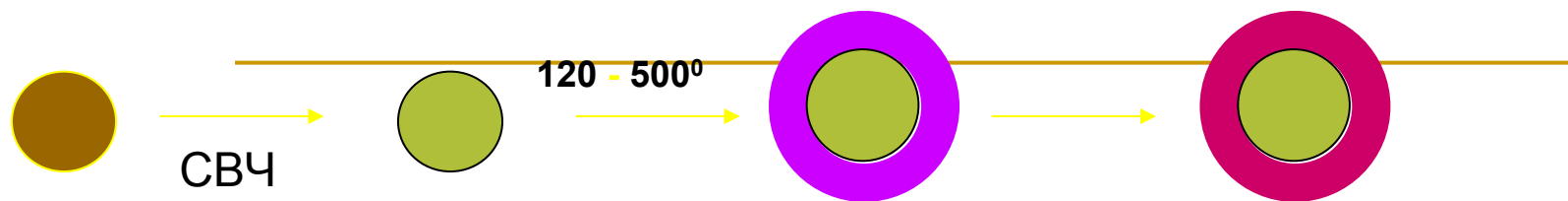
Поликонденсация аминокислот на поверхности наночастиц в микроволновом поле



Наночастицы

(металлы, углерод)

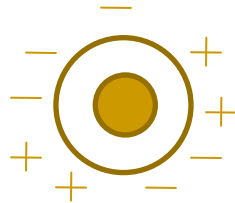
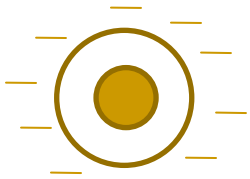
Функционализация поверхности – поликонденсация в микроволновом поле



= введение NH_2 , $COOH$ групп

= гидрофобизация или гидрофилизация поверхности

Ферментоподобные нанокатализаторы



гидрофильные



гидрофобные

Asp

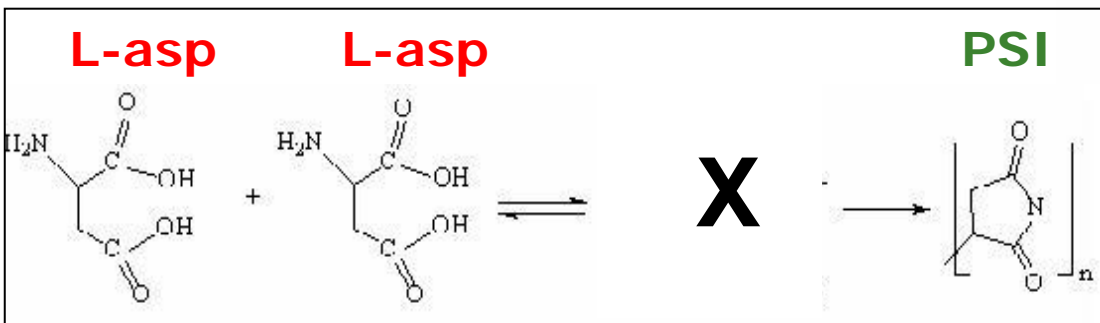
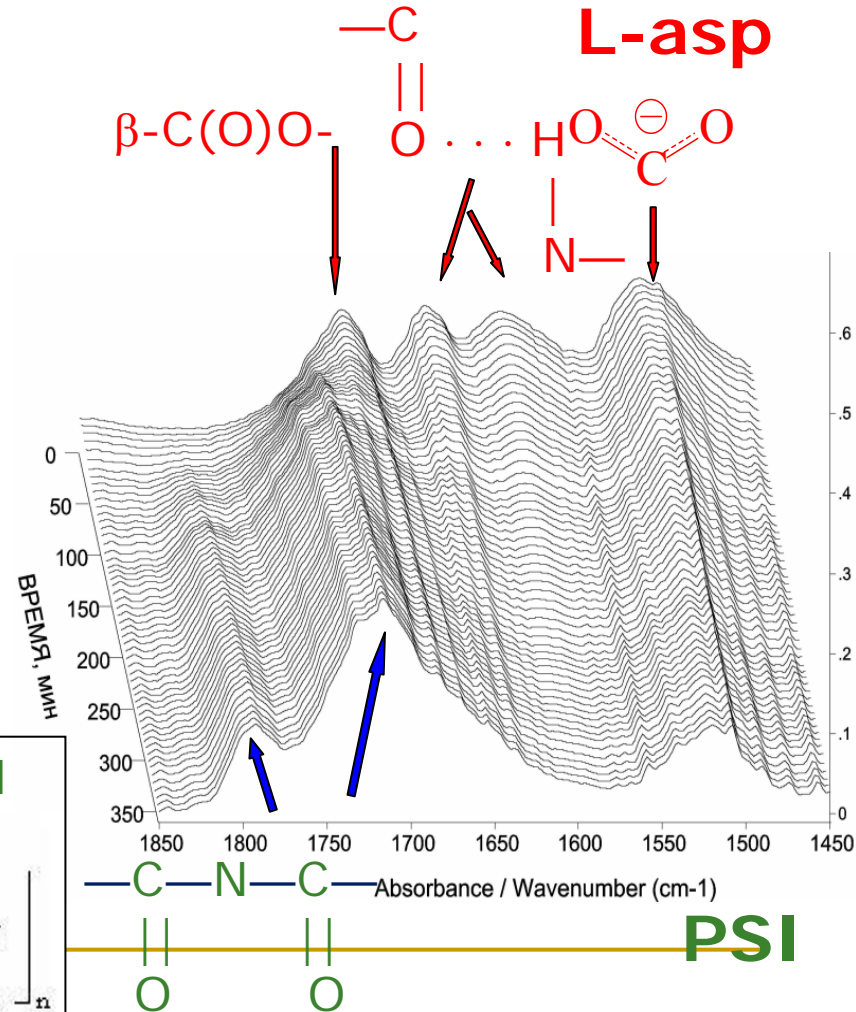
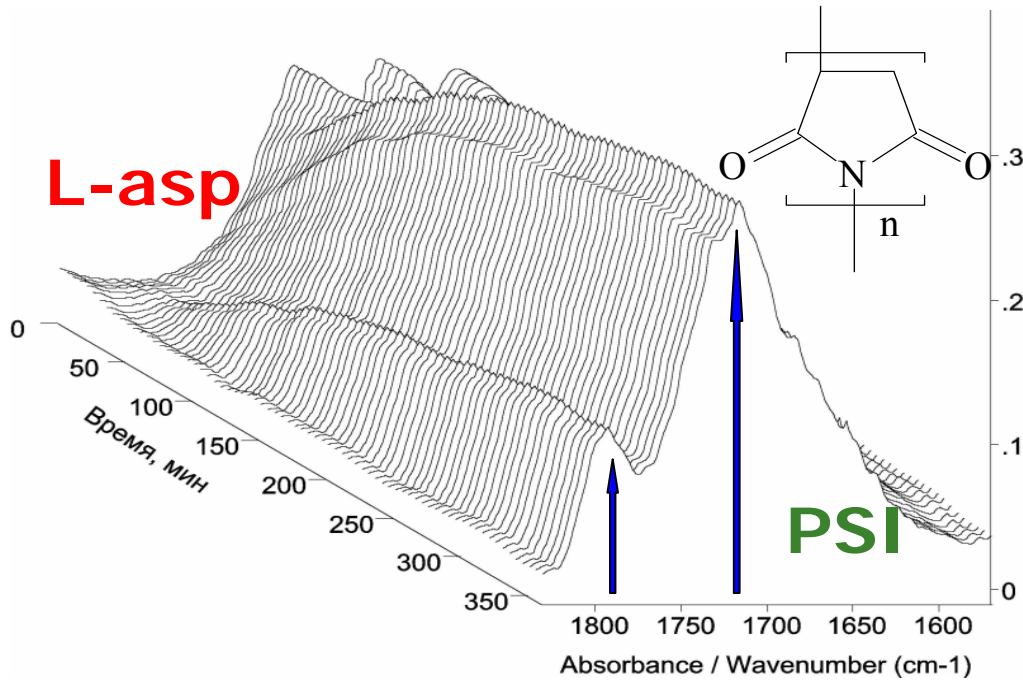
(Asp, Lys) (Asp, Arg)

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

(His Ser)(His Ser Gly)

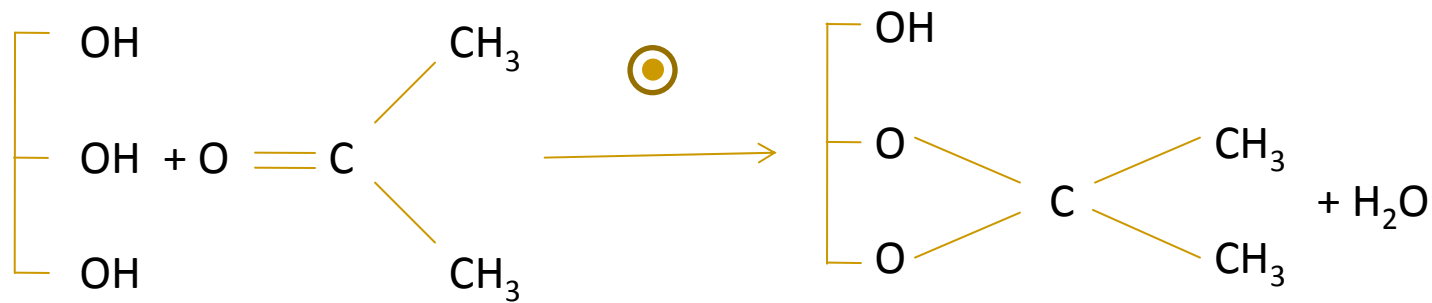
...

FTIR spectroscopy in real time, 215°C



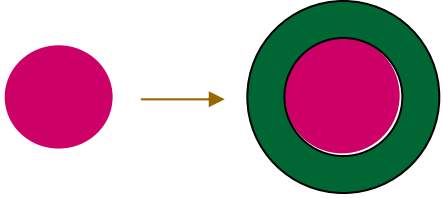
Ферментоподобные нанокатализаторы

Синтез биодобавок, повышающих октановое число бензинов



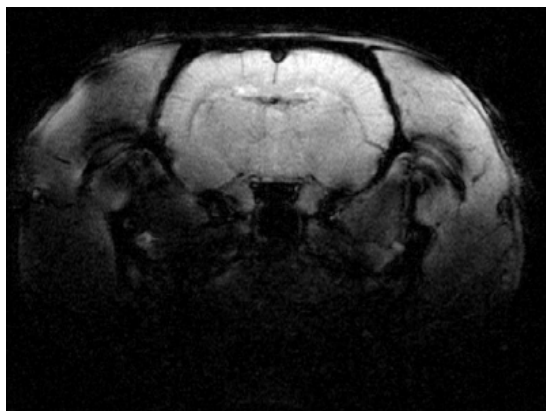
Реакция в органическом растворителе

Ферромагнитные (суперпарамагнитные) наночастицы в центральной нервной системе

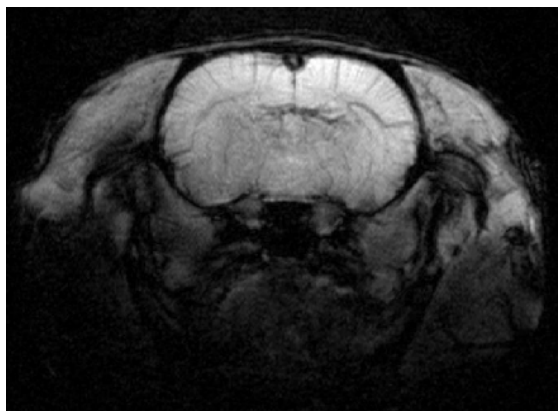
1. -  *Гидрофобная поверхность*
2. - *Контрастирующий агент в ЯМР-томографии*
3. - *Направленный перенос в мозг и другие органы
и ткани*
4. - *Ответ в микроволновом поле*
5. - *Ответы в различных частотах переменного
магнитного поля*

Магнитоуправляемые наночастицы

Контроль



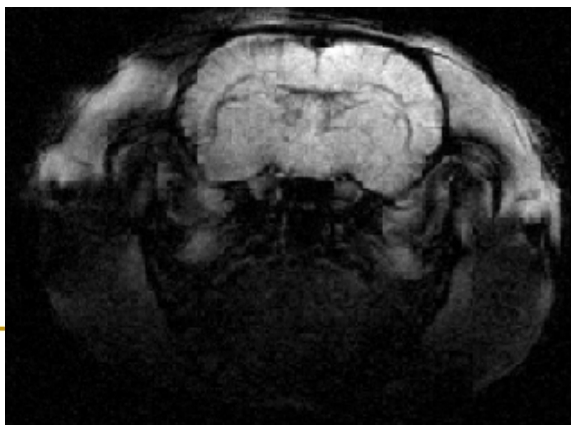
i/v



Модифицированные
ферромагнитные
наночастицы в
организме

***Магнитно-
резонансная
томография***

i/a



Увеличение
ферромагнитных
наночастиц в мозге