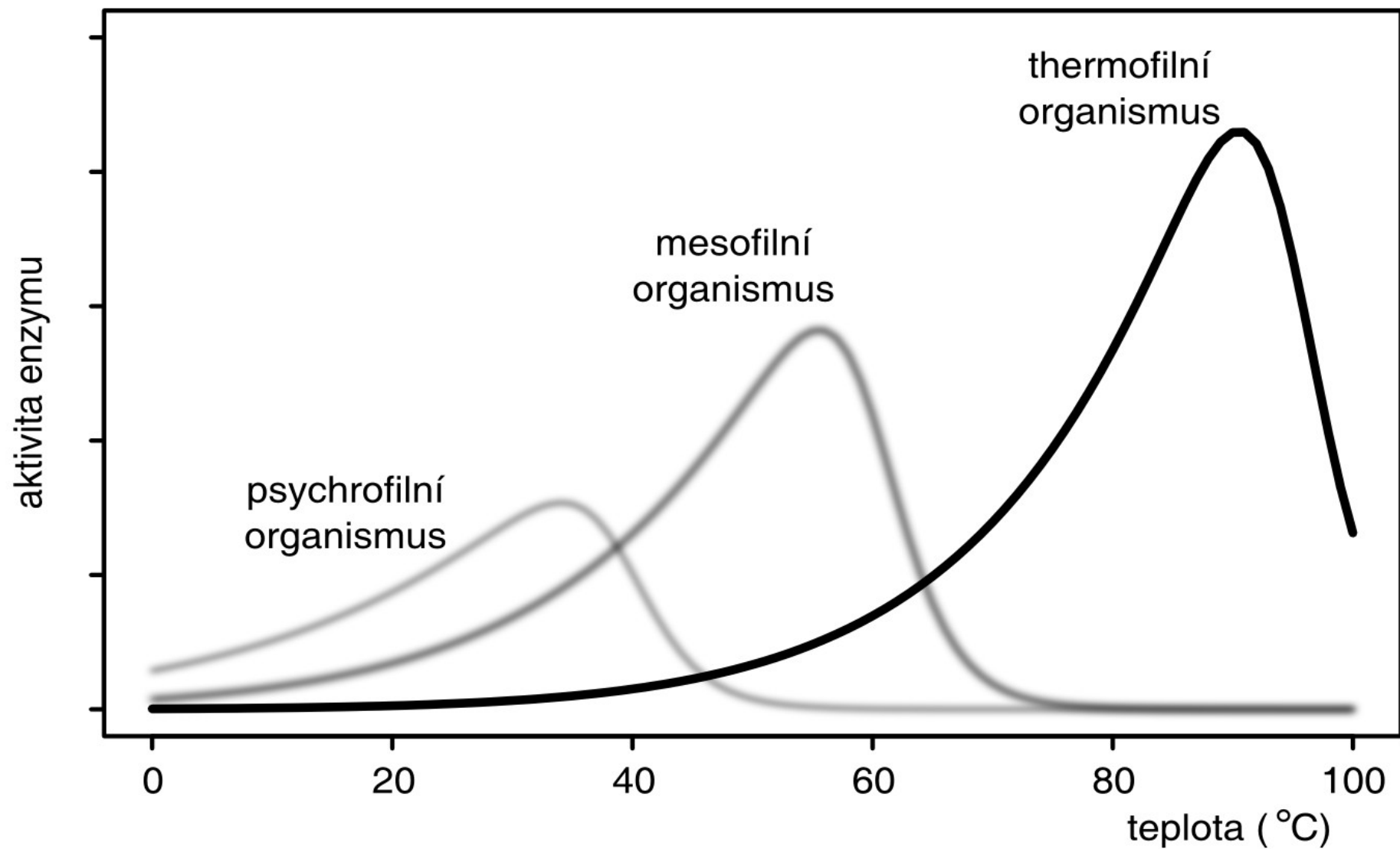


# Enzymové inženýrství

# Jak získat enzym s novými vlastnostmi?

- hledání nových zdrojů
  - organismy z nových zdrojů
  - extremofilní mikroorganismy (psychrofilní, termofilní, hypertermofilní, halofilní, barofilní, ...)
  - genomové projekty
  - metagenomika
- enzymové inženýrství
  - „medium engineering“
  - chemické modifikace
  - racionální metody
  - metody řízené evoluce
    - selekce vs. screening
  - saturační mutagenese

# Závislost aktivity na teplotě, teplotní optimum



medium engineering

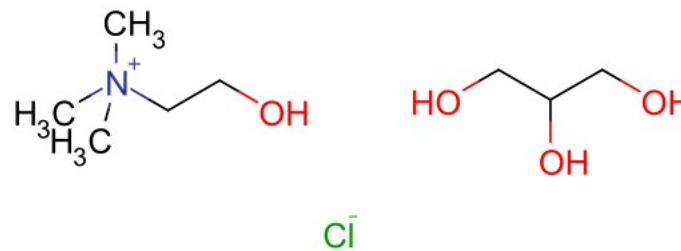
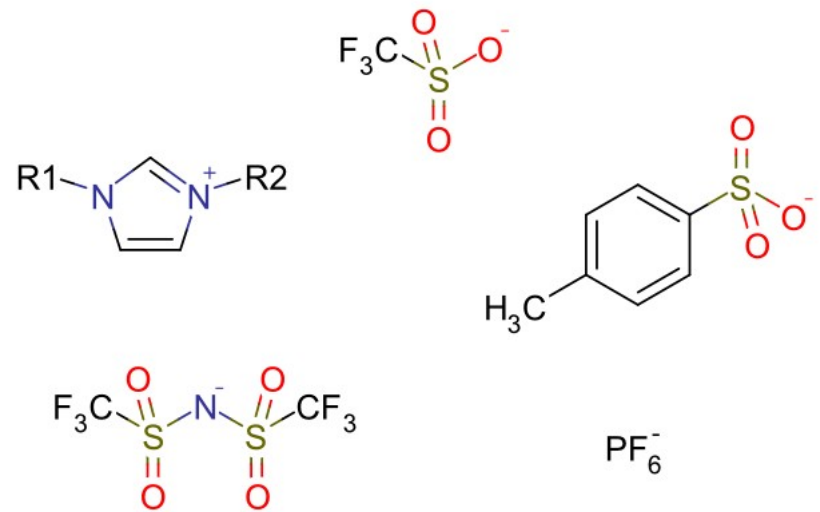
Enzymy v nevodném prostředí

- organická rozpouštědla, DMSO, DMF

- nedetergenní sulfobetainy

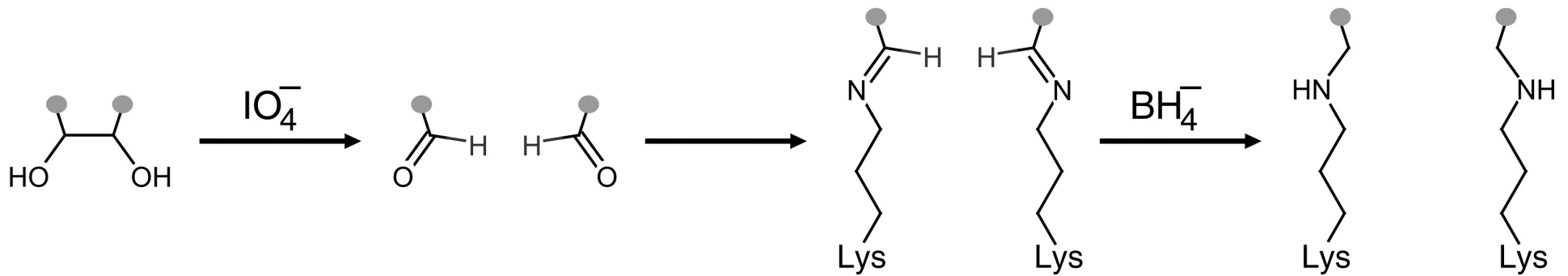
- iontové kapaliny

- hluboce eutektická rozpouštědla



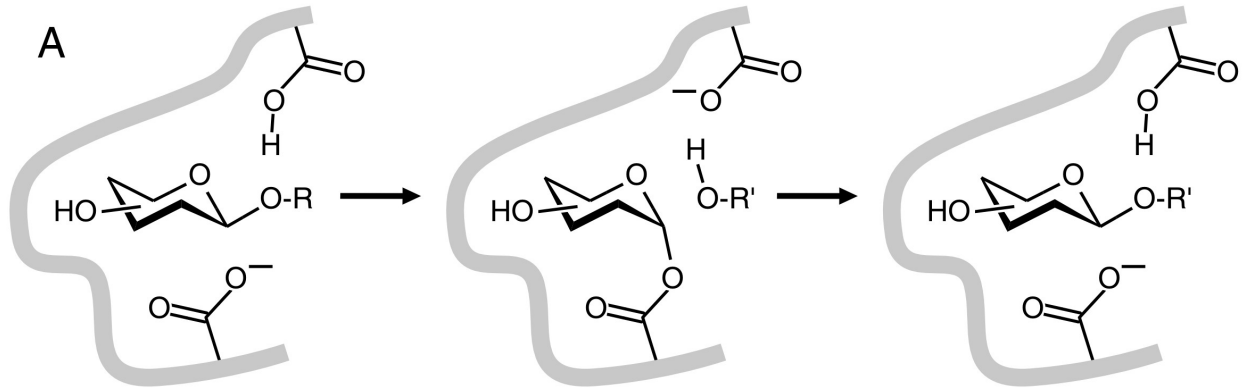
# Chemické modifikace

- immobilisace
- pegylace
- „chemická glykosylace“

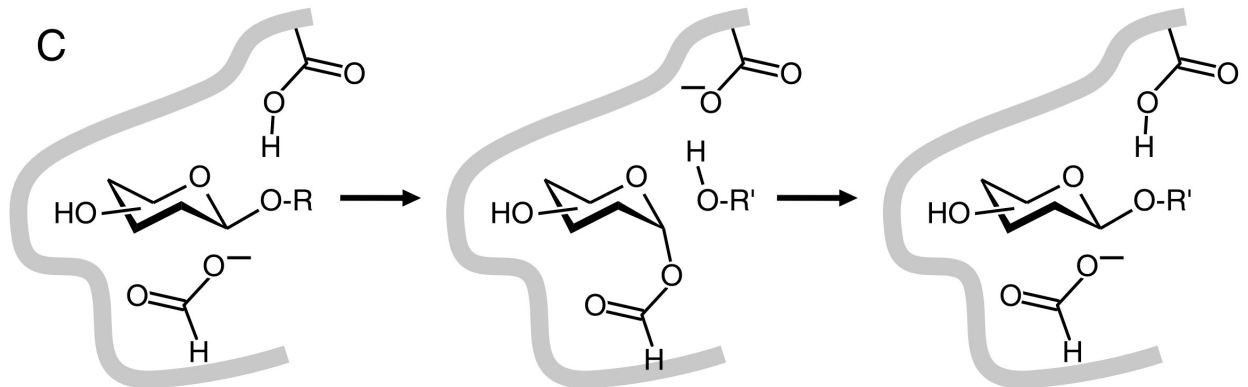
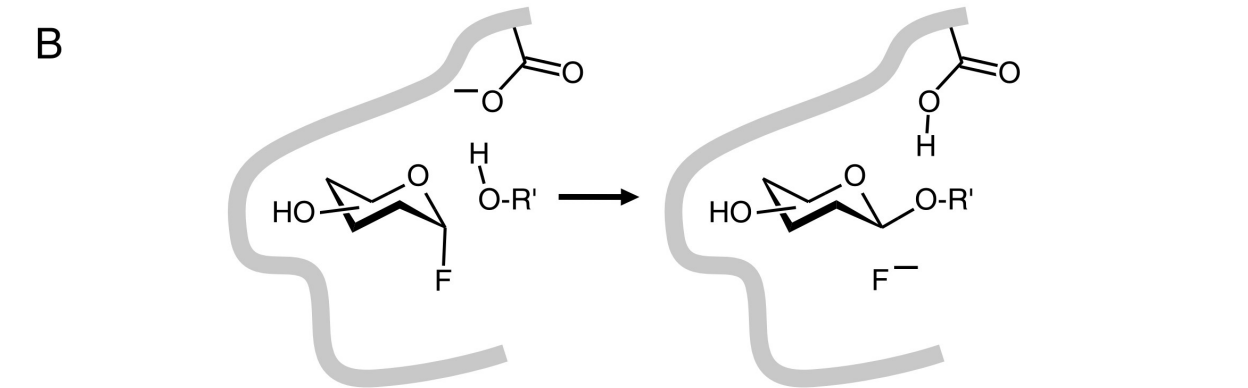


# Racionální metody

## Glykosidasy

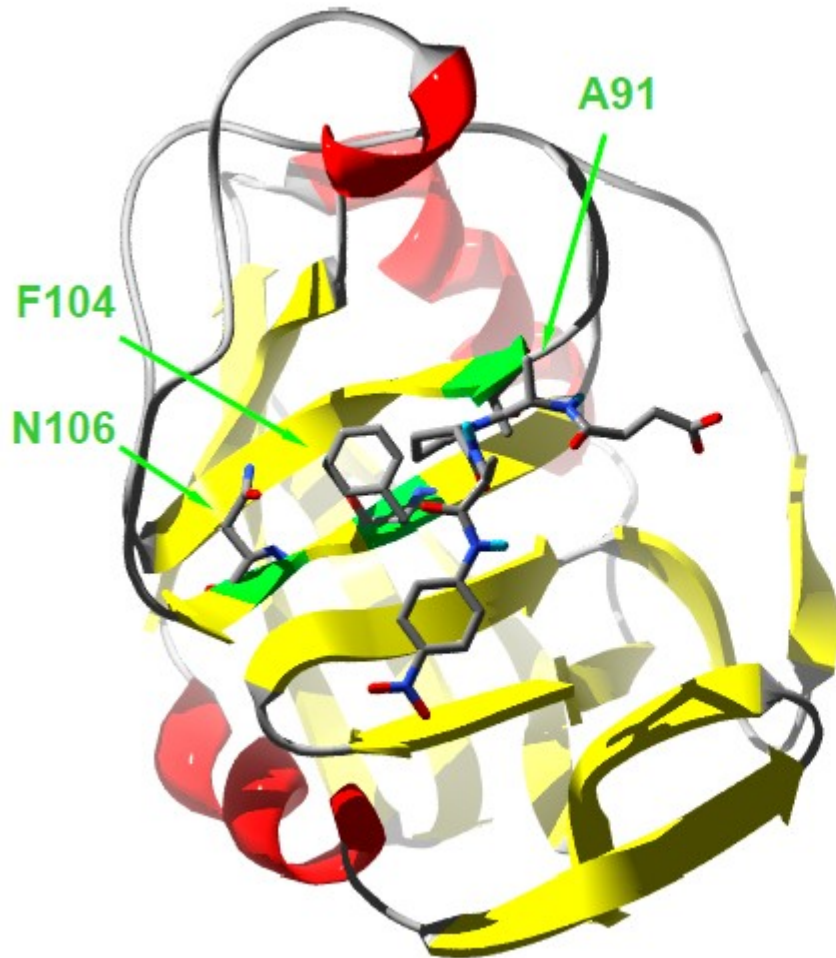


## Glykosynthasy

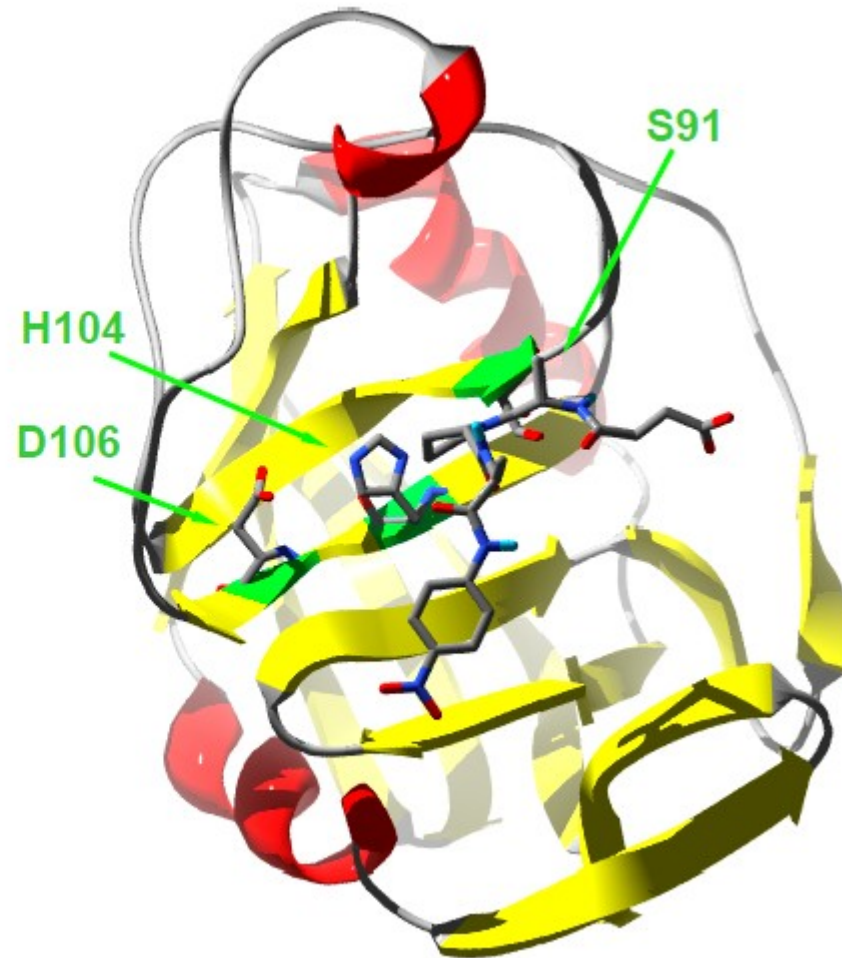


# Racionální metody

Cyclophilin (1LOP)



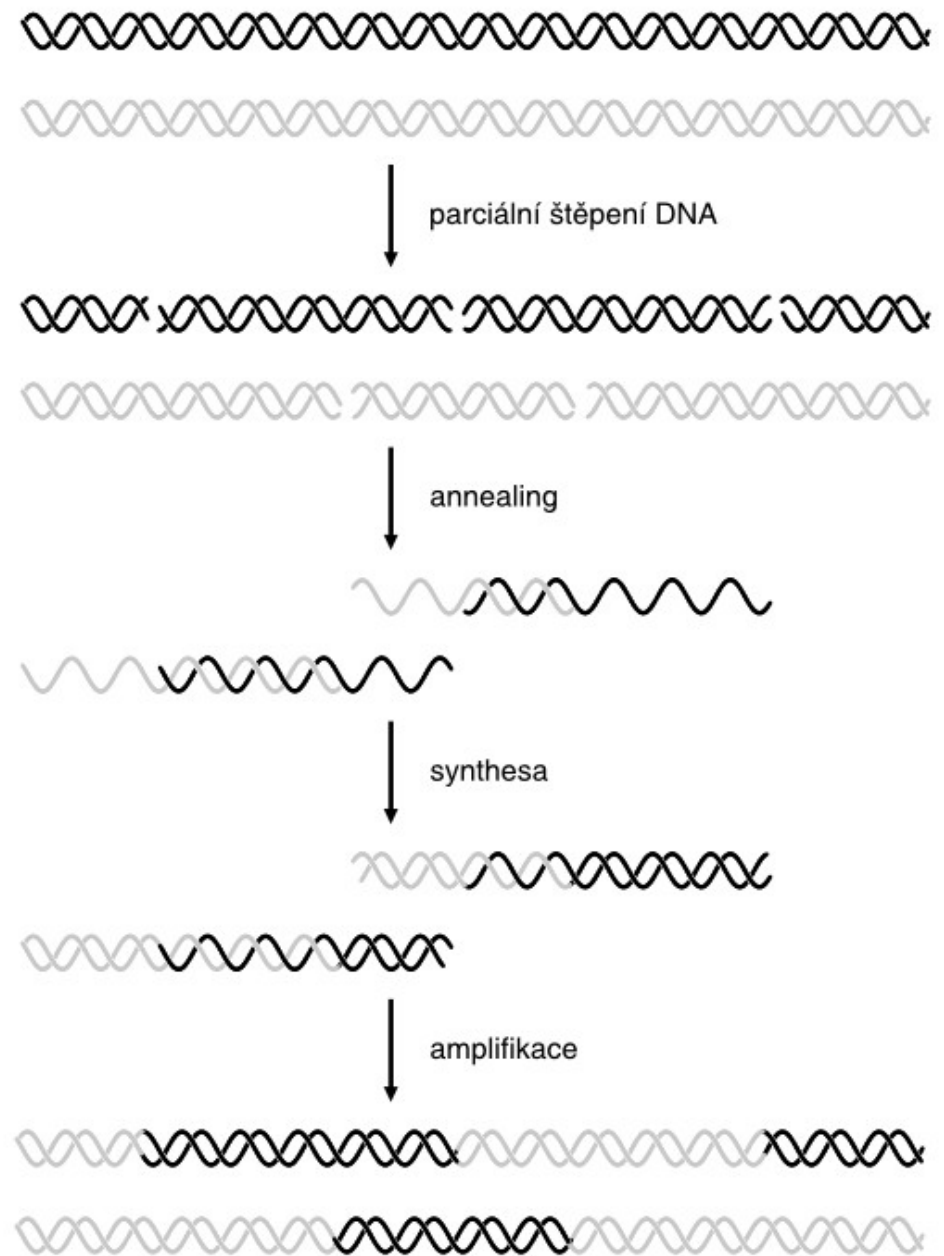
„Cyproasa“ 1  
*E.coli* cyclophilin A91S, F104, N106D



*Nature* 1998, **391**, 301-304.

## Kombinatorické metody

- chemická mutagenese
- error-prone PCR
- kmeny s oslabenými opravnými mechanismy
- DNA-shuffling



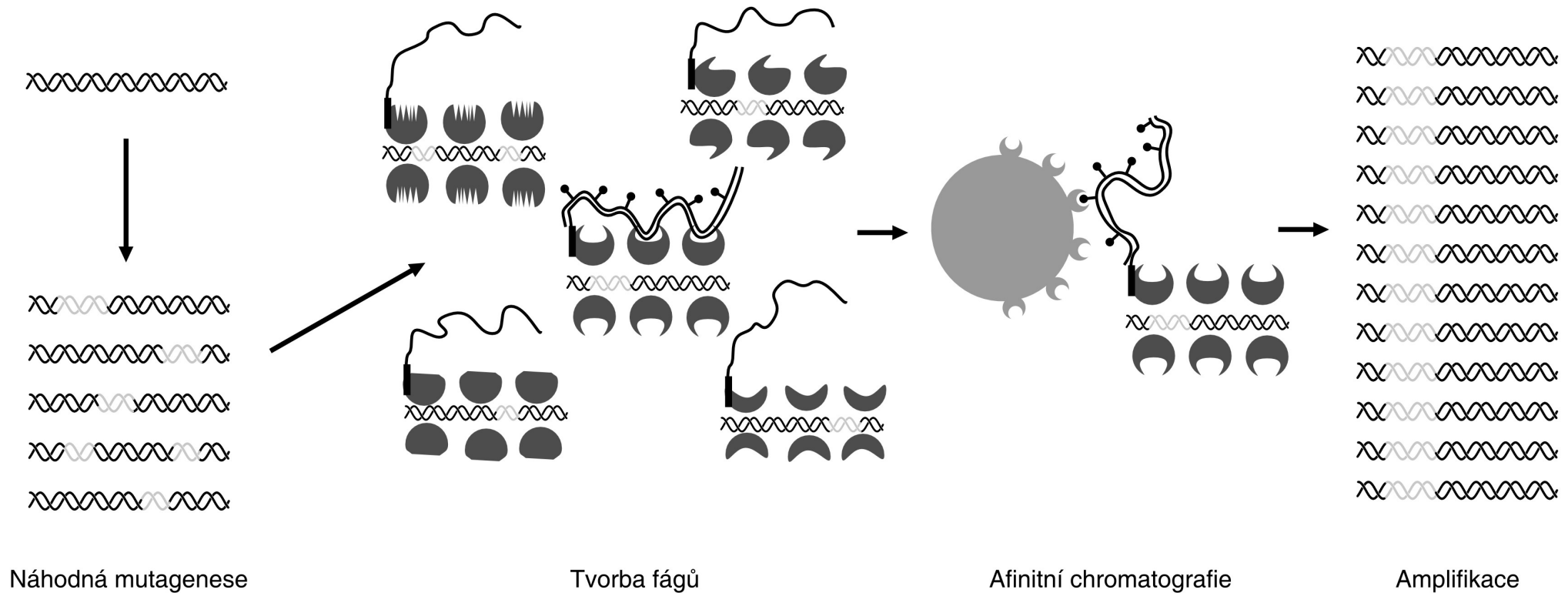


## Kombinatorické metody

- screening – high-throughput screening (HTS),  
fluorescence-activated cell sorting (FACS),  
screening na miskách
- selekce – vystavení selekčním tlakům,  
phage display

# Kombinatorické metody

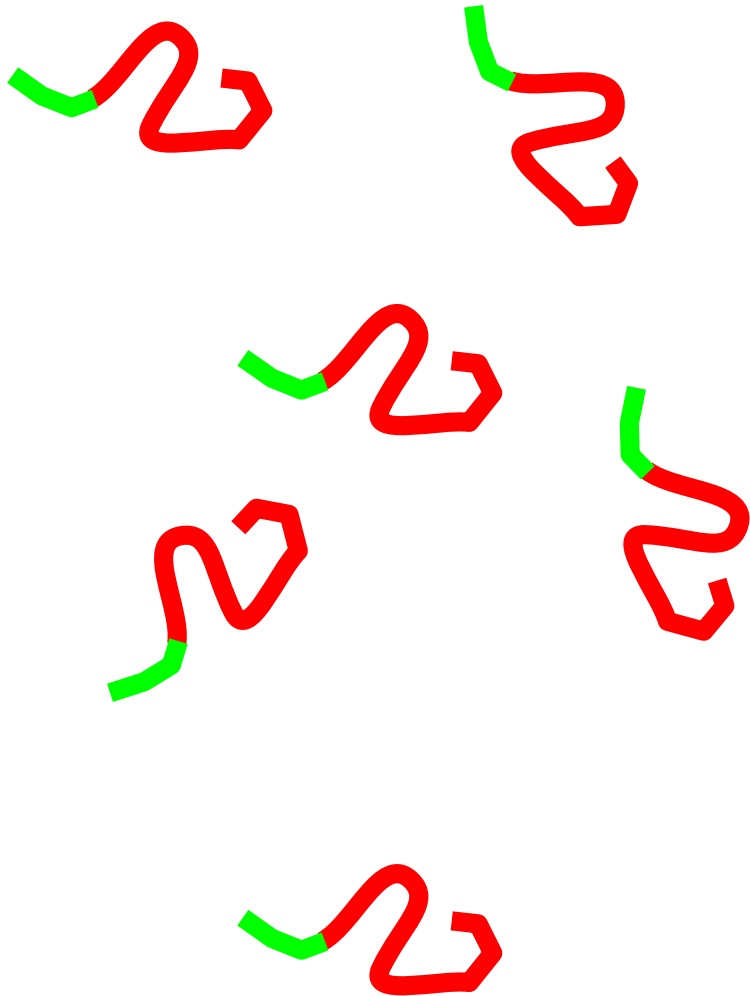
## Phage display – jak udělat z DNA-polymerasy RNA-polymerasu



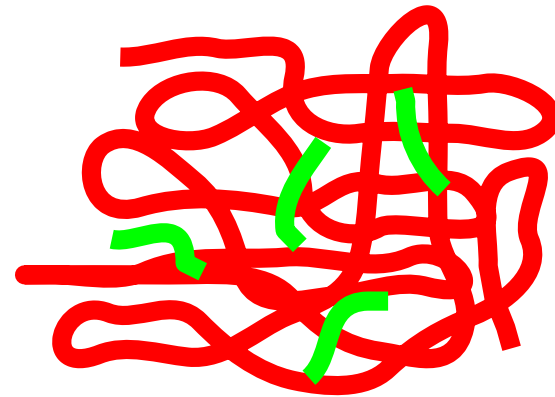
# Kombinatorické metody

## Zvýšení stability a „rozpuštnosti“ proteinů

Nativní



Denaturovaný



## Kombinatorické metody

Thymidinkinasa z viru Herpes Simplex (HSV-TK)

- „suicide gene“ spolu s acyklovirem, ganciklovirem
- možný „bezpečnostní gen“ při genových terapiích a allogenní transplantaci kostní dřeně
- není možné použít pro léčbu HIV, protože antivirotika (např. AZT) působí podobně jako ganciklovir a spol.

HSV1-TK + HSV2-TK

DNA-shuffling



desítky tisíc klonů

Robotizovaný HTS



enzym 32x méně citlivý k AZT než HSV1-TK,  
ale aktivní na ganciklovir