

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ
КАЗАНСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Валиуллина Юлия Анатольевна

**МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, СТРУКТУРА И
АКТИВНОСТЬ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ В КОМПЛЕКСАХ С
АМФИФИЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ**

03.01.02 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Юрий Федорович Зуев

Казань - 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Сериновые протеазы. Структура. Механизм реакционного действия.....	12
1.2. Модификация структуры и активности сериновых протеаз низкомолекулярными лигандами и свойствами микроокружения.....	20
1.3. Супрамолекулярные системы на основе амфифильных соединений.....	25
1.3.1. Поверхностно-активные вещества (ПАВ).....	26
1.3.2. Мицеллярные растворы.....	30
1.3.3. Микроэмульсии.....	32
1.3.4. Солюбилизация.....	35
1.4. Свойства сериновых протеаз в супрамолекулярных системах на основе амфифильных соединений.....	37
1.5. Постановка цели исследования.....	41
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	42
2.1. Объекты исследования.....	42
2.1.1. Ферменты, субстраты.....	42
2.1.2. Амфифильные соединения.....	43
2.2. Приготовление растворов.....	46
2.3. Кинетические измерения.....	47
2.4. ЯМР-самодиффузия.....	53
2.5. Флуоресцентная спектроскопия.....	53
2.6. ИК-спектроскопия.....	54
2.7. Динамическое светорассеяние.....	54

2.8. Молекулярный докинг.....	55
2.9. Исследование солубилизационной емкости растворов ПАВ.....	56
2.10. Статистическая обработка данных.....	56
ГЛАВА 3. СТРУКТУРА И АКТИВНОСТЬ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ В МИКРОЭМУЛЬСИОННЫХ СРЕДАХ.....	57
3.1. Влияние алифатических спиртов на каталитическую активность трипсина в среде обращенных мицелл.....	57
3.2. Влияние заряда межфазной поверхности на структуру и активность трипсина и α -химотрипсина в обращенных мицеллах.....	66
ГЛАВА 4. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ГЕМИНАЛЬНЫХ ПАВ.....	74
4.1. Свойства растворов геминальных ПАВ как среды для ферментативных реакций.....	74
4.2. Структура и каталитическая активность трипсина и α -химотрипсина в растворах геминальных ПАВ с метильными заместителями в головных группах.....	79
4.3. Структура и каталитическая активность трипсина и α -химотрипсина в растворах гидроксилсодержащих геминальных ПАВ.....	96
4.4. Анализ комплексообразования мономеров геминальных ПАВ с трипсином и α -химотрипсином методом молекулярного докинга.....	107
ГЛАВА 5. МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ АМФИФИЛЬНЫМИ АЛКИЛОКСИБЕНЗОЛАМИ.....	112
5.1. Влияние амфифильных алкилоксибензолов на каталитическую активность и структуру трипсина и α -химотрипсина.....	112

5.2. Анализ комплексообразования алкилоксибензолов с трипсином и α -химотрипсином методом молекулярного докинга.....	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	121
ВЫВОДЫ.....	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	125

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АОБ - алкилоксибензолы
- АОТ – бис(2-этилгексил)сульфосукцинат натрия
- БАПНА - N-бензоил DL-аргинин p-нитроанилид
- БТНА - N-бензоил L-тирозин p-нитроанилид
- ВЧ-сдвиг – высокочастотный сдвиг
- ГПАВ - геминальные поверхностно-активные вещества
- ДМСО - диметилсульфоксид
- ДСН – додецилсульфат натрия
- ИК – инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье
- КД – спектроскопия кругового дихроизма
- ККМ – критическая концентрация мицеллообразования
- КСД – коэффициент самодиффузии
- ПАВ – поверхностно-активные вещества
- со-ПАВ – сопутствующее поверхностно-активное вещество
- ТР – трипсин
- ТРИС – трис(гидроксиметил)аминометан
- УФ – ультрафиолетовое излучение
- ХТ – α -химотрипсин
- ЦТАБ – цетилтриметиламмония бромид
- ЭЭБА - этиловый эфир N- α -бензоил-L-аргинина
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс
- Вu – бутанол
- Нex – гексанол
- Оct – октанол

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время все большее внимание привлекают комплексы белков с различными малыми молекулами, в которых модулируется структура и функциональная активность биомакромолекул. Взаимодействие белков с амфифильными соединениями является предметом многолетнего интереса исследователей, поскольку амфифильными свойствами обладают многие природные регуляторные молекулы. Кроме того, амфифильные соединения находят применение в аналитической молекулярной биологии, в пищевых, фармакологических и косметических производствах, в доставке лекарств, при создании нанокапсул, конструировании каталитических и сенсорных систем (Flanagan, Slingh, 2006; Spornath, Aserin, 2006; Colomer et al., 2011; He et al., 2012; Muzaffar et al., 2013; Ahammed et al., 2013; Das et al., 2014). Установлено, что свойства белков в комплексах с амфифильными соединениями зависят от таких характеристик этих соединений, как заряд и размер полярной головной группы, длина алифатических радикалов (Otsen et al., 2011; Mondal et al., 2016). В настоящей работе в качестве представителей белков выбраны сериновые протеазы, катализирующие гидролиз пептидных или эфирных связей, которые часто используются как модельные объекты для экспериментальных и теоретических исследований. Наличие разнообразного экспериментального материала по структуре этих белков и кинетике катализируемых ими реакций делает этот класс ферментов удобным объектом для изучения механизмов межмолекулярного взаимодействия, для разработки и тестирования различных моделей, где необходимо получить корреляцию структура-свойство (активность).

Большинство работ по изучению комплексов белков с поверхностно-активными веществами (ПАВ) посвящено классическим одноцепочечным ПАВ. Димерные (геминальные) ПАВ (ГПАВ), которые используются в настоящей работе, содержат два гидрофобных радикала, соединенных спейсером через

полярные головные группы, что позволяет расширить границы регулируемых свойств комплексов с белками (Wu et al., 2007; Gull et al., 2009). Этому способствуют более низкие температура Крафта и критические концентрации мицеллообразования (ККМ) (Domingos et al., 2004; Kumar et al., 2004). Специфика гидроксилсодержащих ГПАВ дополнительно заключается в возможности водородного связывания между молекулами и придания измененных свойств ассоциатам ПАВ. Работ, в которых изучалось взаимодействие ГПАВ с белками сравнительно немного. Установлено, что длина спейсера оказывает влияние на взаимодействие геминальных ПАВ с бычьим сывороточным альбумином, желатином, РНКазой А и гемоглобином (Wang et al., 2013; Gospodarczyk et al., 2014; Tai et al., 2014; Mir et al., 2014). Отдельной строкой в нашей работе стоят структурно-функциональные исследования сериновых протеаз в системе обращенных мицелл, что направлено на исследование проблем неводной энзимологии.

Для моделирования регуляторного действия природных амфифильных соединений – регуляторов биохимических процессов, нами выбран ряд синтетических аналогов микробных низкомолекулярных ауторегуляторов - алкилоксибензолов (АОБ). АОБ оказывают защитное действие на клетки бактерий и дрожжей в условиях окислительного стресса, температурного шока, на клетки млекопитающих в присутствии химических и биологических токсикантов (Ильинская и др., 2002; Степаненко и др., 2005; Parikka et al., 2006; Landberg et al., 2009; Andersson et al., 2010). Известно, что АОБ могут играть роль естественных структурных модификаторов ферментов. Химические свойства АОБ определяют их способность к нековалентным взаимодействиям с биологическими молекулами и надмолекулярными структурами (мембранами) за счет образования межмолекулярных водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий, которые могут приводить к изменению функциональной активности ферментов. Кроме того, обнаружено, что АОБ участвуют в модификации структуры ферментов с образованием комплексов, обладающих повышенной устойчивостью к денатурирующим воздействиям.

Амфифильные молекулы АОБ способны образовывать мицеллярные агрегаты, что, в свою очередь, оказывает влияние на функционирование ферментов (Мартиросова и др., 2014). Однако, несмотря на большое количество работ по регуляции активности ферментов в процессе анабиоза, молекулярные механизмы их действия в своем большинстве остаются открытыми.

Цель работы: поиск корреляций структура/свойство (активность) для сериновых протеаз при их взаимодействии с низкомолекулярными амфифильными лигандами.

Для достижения поставленной цели планировалось решение следующих **задач**:

1. Охарактеризовать структуру и другие физико-химические свойства используемых систем белок/амфифил;
2. Произвести оценку локализации белков и субстратов в ассоциатах на основе амфифильных соединений;
3. Провести оценку структуры комплексов белок-лиганд методом молекулярного докинга;
4. Охарактеризовать каталитическую активность трипсина и α -химотрипсина в составе комплексов с амфифильными соединениями;
5. Построить феноменологические модели регуляторного действия исследованных амфифильных соединений на активность сериновых протеаз.

Для выполнения поставленных задач были использованы следующие методические подходы:

1. Измерение коэффициентов самодиффузии в растворах амфифильных соединений (метод-ЯМР);
2. Исследования распределения частиц по размерам в системах белок-амфифил (метод динамического светорассеяния, ЯМР);
3. Оценка растворимости субстратов в буферном растворе и в растворе ПАВ;
4. Регистрация ИК-спектров трипсина и α -химотрипсина в заявленных растворах амфифилов (метод ИК-спектроскопии);

5. Измерения вероятности образования комплексов белок-лиганд (метод молекулярного докинга);
6. Регистрация спектров флуоресценции триптофановых остатков трипсина и α -химотрипсина в буферном растворе и в заявленных растворах амфифилов;
7. Регистрация кинетических кривых реакции ферментативного гидролиза специфических субстратов в буферном растворе и в растворах заявленных амфифилов (метод УФ-спектроскопии) и определение начальных скоростей реакции и параметров уравнения Михаэлиса-Ментен.

Научная новизна работы. Получены данные о влиянии широкого спектра амфифильных веществ различного строения на структуру и каталитическую активность трипсина и α -химотрипсина. Впервые охарактеризована солюбилизирующая способность мицеллярных растворов исследованных амфифильных соединений по отношению к ряду субстратов. Определены кинетические параметры исследуемой реакции в растворах амфифильных соединений. Впервые показана возможность не только ингибирования, но и активации сериновых протеаз в растворах исследованных амфифилов. Показано, что регуляция активности сериновых протеаз в растворах амфифильных соединений осуществляется как за счет изменения доступности субстрата к активному центру фермента, так и при изменении структуры белка.

Научно-практическая значимость работы. Изучение регуляции активности сериновых протеаз в микрогетерогенных системах имеет большое значение для понимания принципов функционирования ферментов, а также для решения многих прикладных вопросов, связанных с промышленными применениями ферментативного катализа. Результаты работы могут быть использованы для регуляции активности ферментов в технологических процессах.

Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть использованы в учреждениях биологической, биотехнологической и физико-химической направленности, занимающихся

современными проблемами энзимологии, исследованием взаимосвязи структуры и функции биомакромолекул, а также изучением влияния микроокружения на активность ферментов. Представленные материалы могут использоваться в учебном процессе при чтении курсов лекций по биофизике, биохимии и молекулярной биологии.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Исследования проводились в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по теме «Межмолекулярные взаимодействия и молекулярная динамика как факторы регуляции функциональной активности белков» (номер госрегистрации №0120.0 803026) и частично поддержаны грантами РФФИ № 05-03-33110-а, № 09-03-00778-а, а также грантом Президиума РАН (программа «Молекулярная и клеточная биология»). Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора, либо полученных при его непосредственном участии совместно с сотрудниками КИББ КазНЦ РАН с.н.с., к.б.н. Идиятуллиным Б.З. (ЯМР-спектроскопия), с.н.с., к.х.н. Ермаковой Е.А. (молекулярный докинг), с.н.с., к.б.н. Файзуллиным Д.А. (ИК-спектроскопия).

Положения, выносимые на защиту:

1. Выбор строения и концентрации амфифильных соединений позволяет целенаправленно регулировать активность сериновых протеаз.
2. Механизм регуляторного действия амфифильных соединений заключается в создании среды, которая за счет своего микрогетерогенного строения модулирует структуру фермента и изменяет степень доступности субстрата к активному центру.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на III и IV Съездах биофизиков России (Воронеж – 2004, Нижний Новгород – 2012); на XI, XII, XIV, XVII и XVIII Всероссийских конференциях «Структура и динамика молекулярных систем» (Яльчик – 2004, 2005, 2007, 2010, 2011); на VI Всероссийском симпозиуме «Химия протеолитических ферментов» (Москва - 2007); на IV, V и VI Российских симпозиумах «Белки и

пептиды» (Казань – 2009, Петрозаводск – 2011, Уфа – 2013); на Российской школе молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии» (Казань – 2010); на Всероссийском симпозиуме по поверхностно-активным веществам «От коллоидных систем к нанохимии» (Казань – 2011); на III Международном симпозиуме «Клеточная сигнализация у растений» (Казань - 2011).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 статей (из них 4 в журналах из списка ВАК; 6 в сборниках) и 18 тезисов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 191 источник, из них 146 зарубежных. В работе представлено 8 таблиц и 68 рисунков.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность за ценные советы, неоценимую помощь и всестороннюю поддержку при выполнении диссертационной работы научному руководителю – доктору химических наук, профессору Юрию Федоровичу Зуеву.

Автор благодарит сотрудников лаборатории биофизической химии наносистем КИББ КазНЦ РАН: Джигангира Асхатовича Файзуллина, Елену Андреевну Ермакову, Булата Зямиловича Идиятуллина, Наталью Леруновну Захарченко за помощь в проведении экспериментов, анализе и обсуждении данных. Автор благодарит Аллу Бенционовну Миргородскую (ИОФХ им. А.Е. Арбузова КИББ КазНЦ РАН) за предоставленные реактивы, ценные советы. Автор выражает благодарность всем сотрудникам лабораторий биофизической химии наносистем КИББ КазНЦ РАН и своей семье за моральную поддержку и теплую атмосферу.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Сериновые протеазы. Характеристика. Структура. Механизм реакционного действия

Наиболее изученный и широко представленный подкласс ферментов в окружающей среде - это группа сериновых протеаз, представители которых являются участниками многих протеолитических систем организма (Hedstrom, 2002; Horwitz et al., 2003; Freeman, 2008; Salvesen, Riedl, 2008). В основе классификации протеаз лежит строение активного (каталитического) центра (Barrett, 1994; Bühling et al., 2006). Сериновые протеазы получили свое название благодаря содержанию в активном центре важного для каталитического действия этих ферментов остатка серина (Фершт, 1980; Кольман, Рё, 2009).

Сериновые протеазы катализируют гидролиз пептидной связи (C-N) (рис. 1) и их субстрат-связывающий центр включает оксианионовую “дыру”, связывающую кислород субстрата, неспецифическую пептид-связывающую площадку, отвечающую, совместно с оксианионовой дырой, за правильное расположение разрываемой пептидной связи для атаки нуклеофильным кислородом серина, а также специфический субстрат-связывающий карман. Формой этого кармана, зависящей от природы фермента, определяется заместитель, рядом с которым будет происходить разрыв белковой цепи (Доброгорская и др., 2003).

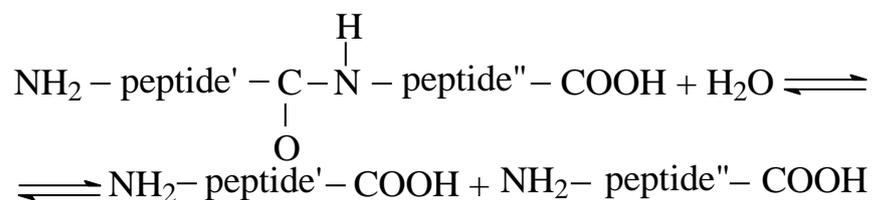


Рис. 1. Схема гидролиза пептидной связи

Известными представителями сериновых протеаз являются трипсин, химотрипсин, энтеропептидаза, урокиназа, эластаза, калликреины плазмы и крови, некоторые факторы свертывания крови. Наиболее исследованными ферментами этой группы протеаз являются химотрипсин и трипсин, которые содержатся в секрете поджелудочной железы человека и животных и участвуют в расщеплении белков пищи в тонком кишечнике.

Трипсин синтезируется в поджелудочной железе в виде неактивного предшественника (профермента) трипсиногена. Образование активного трипсина из трипсиногена сопровождается отщеплением гексапептида с появлением новой (N-концевой) аминокислоты – изолейцина. Следовательно, разрыв только одной пептидной связи приводит к образованию активного центра. Трипсин проявляет специфичность в реакциях гидролиза сложноэфирных, амидных и пептидных связей, образованных карбоксильной группой положительно заряженной аминокислоты (в первую очередь лизина и аргинина). Молекулярная масса трипсина составляет около 24 кДа, молекула состоит из 223 аминокислотных остатков, образующих одну полипептидную цепь, и содержит 6 дисульфидных связей.

Химотрипсин обладает гораздо более широкой специфичностью, чем трипсин (Овчинников, 1987) и секретируется в форме профермента – химотрипсиногена поджелудочной железой позвоночных животных. Превращение химотрипсиногена в химотрипсин также вначале сопровождается отщеплением одного пептида, в результате такого отщепления происходит радикальная перестройка конфигураций полипептидных цепей с увеличением количества спирализованных структур (Антонов, 1991). Активация профермента происходит в двенадцатиперстной кишке под действием трипсина. Физиологическая функция химотрипсина – гидролиз белков и полипептидов. Химотрипсин атакует преимущественно пептидные связи образованные карбоксильными группами остатков тирозина, триптофана, фенилаланина и метионина, а также эффективно гидролизует сложные эфиры соответствующих аминокислот. Молекулярная масса химотрипсина около 25

кДа, молекула его содержит 241 аминокислотных остатков. Химотрипсин образован тремя полипептидными цепями, которые связаны дисульфидными мостиками (рис. 2) (Кольман, Рё, 2009).

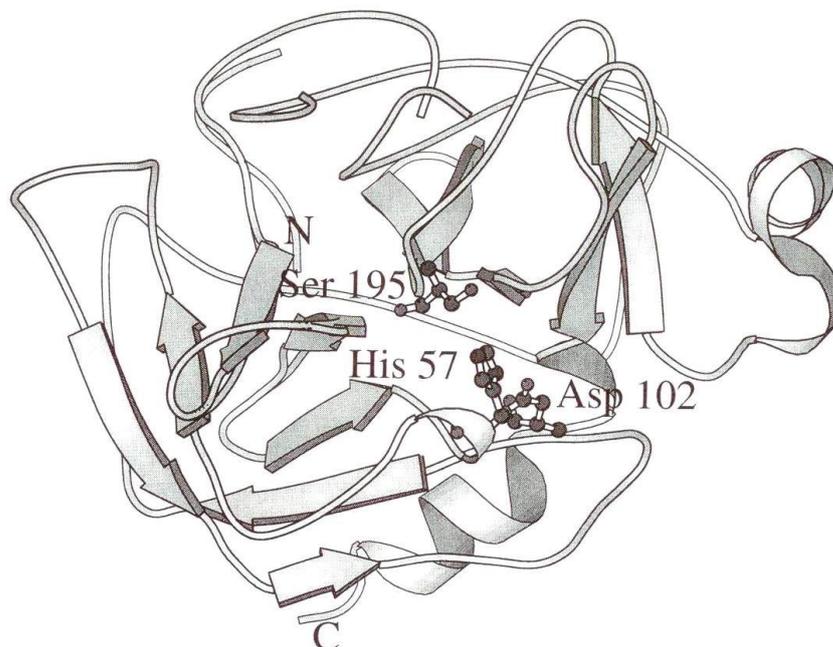


Рис. 2. Третичная структура α -химотрипсина (Ser 195, His 57, Asp 102 – аминокислотные остатки активного центра).

Трипсин и химотрипсин имеют значительное сходство в последовательности аминокислот и близки по третичной структуре. Полипептидные цепи в α -химотрипсине образуют систему антипараллельных β -шпилек, связанных сеткой водородных связей. Два коротких α -спиральных участка расположены в С-концевой области цепи С (остатки 232-245) и в области остатков 165-172. Большинство β -шпилек свернуты таким образом, что образуют как бы два искаженных цилиндра. Цилиндр 1 включает остатки 29-112 и состоит из шести антипараллельных цепей. Цилиндр 2 образуется остатками 133-230 и также включает шесть антипараллельных отрезков полипептидной цепи. Четыре из пяти дисульфидных мостиков входят в состав этого цилиндра. Боковые группы гидрофобных аминокислот ориентированы внутрь цилиндров, а гидрофильные, как правило, расположены на их

поверхности. Оба цилиндра соприкасаются друг с другом, причем некоторые остатки гидрофобных аминокислот ориентированы в область контакта (Trp29, Ile47, Trp51, Val53, Phe89, Ile103, Leu105 и Ile212). С-концевая α -спираль также контактирует с обоими цилиндрами. В области контакта расположено около 10% молекул воды, связанных с белком. Примерно такое же количество молекул воды локализовано внутри глобулы. Остальные 80% связаны с поверхностью молекулы белка (рис. 2) (Антонов, 1991). Трипсин построен очень сходным образом и состоит из двух доменов, тесно контактирующих один с другим.

Химотрипсин-подобные сериновые протеазы, были выделены по наличию каталитической триады Asp-His-Ser. Каталитическая триада является частью протяженной сети водородных связей и располагается в активном центре фермента таким образом, что Ser195 находится на одной его стороне, а Asp102 и His57 – на противоположной (рис. 3).

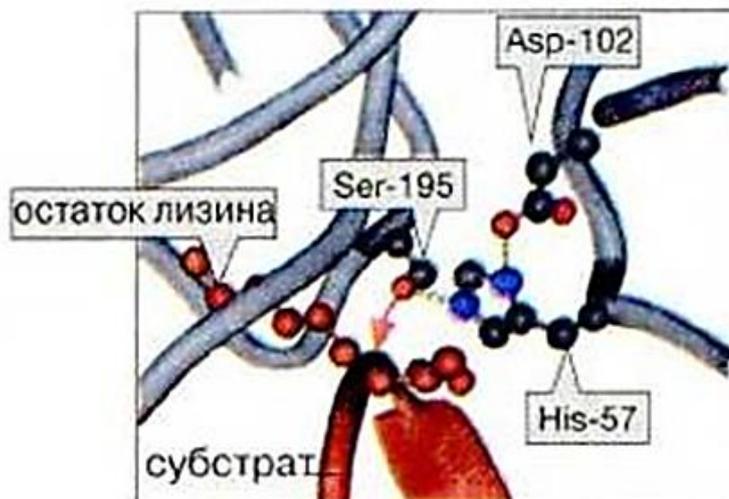


Рис. 3. Активный центр трипсина. Остаток серина при участии остатков гистидина и аспарата нуклеофильно атакует расщепляемую связь (стрелка). Отщепляемая часть пептидного субстрата расположена в С-концевой стороне от остатка лизина (Кольман, Рё, 2009).

Благодаря четкой структуре специфической части субстрат-связывающего «кармана», сериновые протеазы расщепляют полипептид только после определенных аминокислот: химотрипсин – после ароматических, трипсин – после положительно заряженных. Однако если в случае α -химотрипсина эта полость является гидрофобной и образована в основном неполярными боковыми цепями соответствующих аминокислот, то в случае трипсина субстрат-связывающая полость содержит отрицательно заряженную карбоксильную группу и принадлежит боковой цепи остатка Asp-189, находящегося на «дне» гидрофобной полости и заменяющего остаток Ser-189 в связывающем центре α -химотрипсина (рис. 4) (Blow et al., 1970; Клесов, 1977).

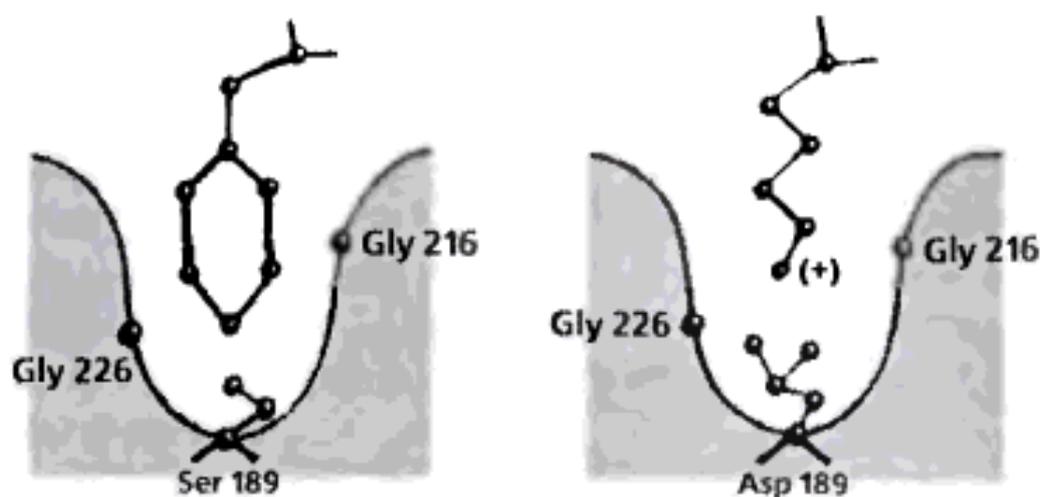


Рис. 4. Устройство специфического сайта субстрат-связывающего «кармана» трипсина и α -химотрипсина. (Branden, Tooze, 1991)

Именно это различие в первичной структуре полипептидных фрагментов обуславливает различие в субстратной специфичности данных ферментов и приводит к тому, что в отличие от α -химотрипсина трипсин обнаруживает специфичность к гидролизу пептидных связей, образованных положительно заряженными аминокислотами (лизин, аргинин) (Филькенштейн, Птицын, 2002).

Механизм ферментативного катализа сериновых протеаз. Процесс гидролиза пептидной связи субстрата включает 6 взаимосвязанных стадий, успешную реализацию которых обеспечивает активная зона фермента (рис. 5). Как упоминалось выше, эта зона состоит из каталитического центра, в котором происходит химическая трансформация, и субстрат–связывающего центра, обеспечивающего правильное положение субстрата. Сериновые протеазы функционируют по механизму нуклеофильного катализа, катализ пептидной связи осуществляется боковой цепью серина (Ser 195), содержащей ОН-группу. Сама гидроксильная группа не является сильным нуклеофилом, поэтому для протекания реакции необходим перенос протона с гидроксильной группы на основание, роль которого в сериновых протеазах выполняет гистидин (His 57). Было показано, что аспарагиновая кислота (Asp 102) находящаяся в непосредственной близости от остатка гистидина, также принимает активное участие в процессе катализа (Доброгорская и др., 2003; Vachovchin et al., 1978).

В первую очередь в результате взаимодействия His57 и Ser195 образуется сильный нуклеофил, он атакует карбонильную группу пептида с образованием тетраэдрического ацилфермента. Тетраэдрический комплекс распадается и разрывает пептидную связь. Часть полипептидной цепи остается связанной с Ser195, после она атакуется образовавшимся из молекулы H_2O под действием His57 гидроксид ионом. Второй образовавшийся тетраэдрический интермедиат распадается и освобождается второй продукт реакции (Варфоломеев и др., 2000).

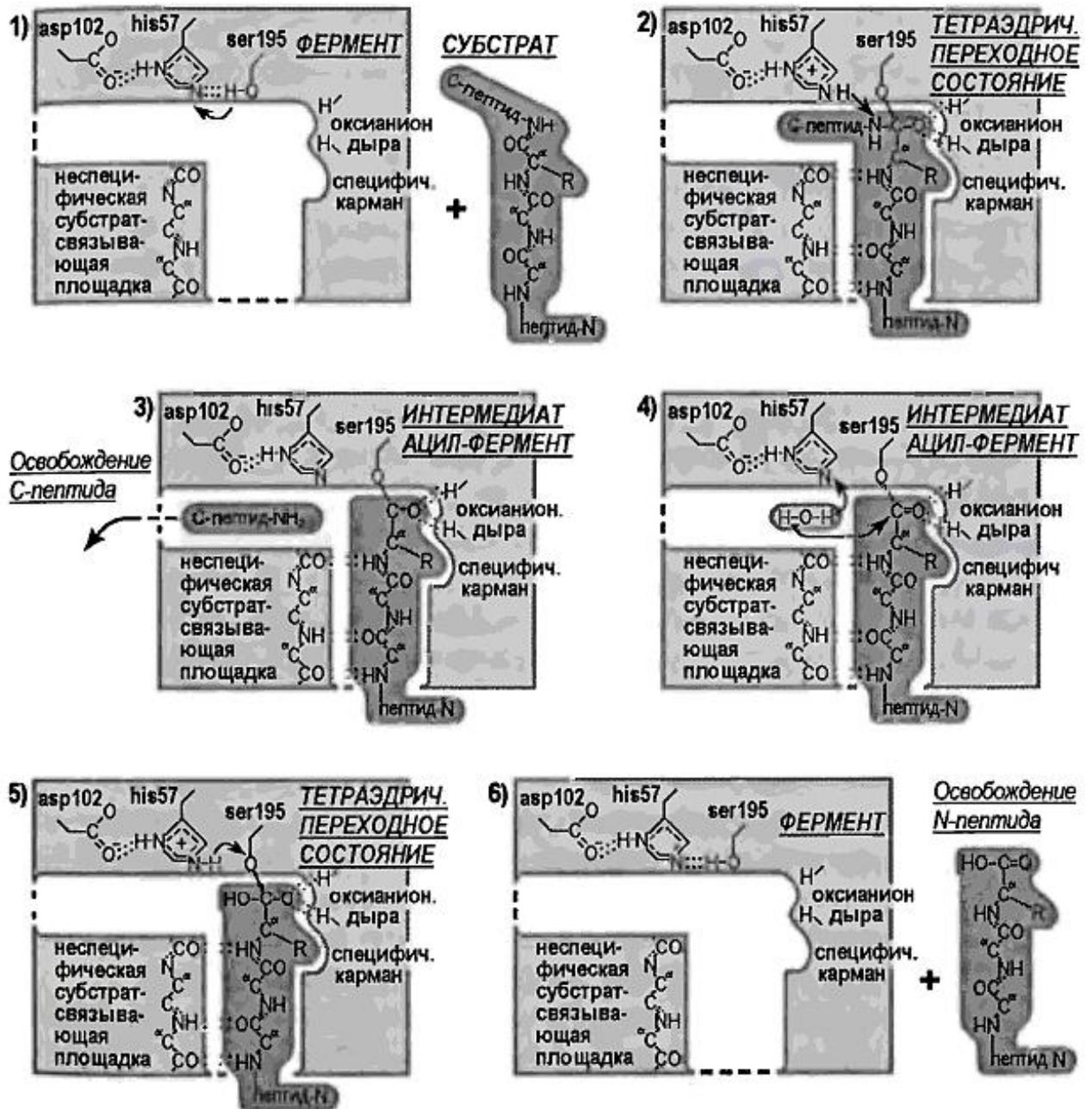
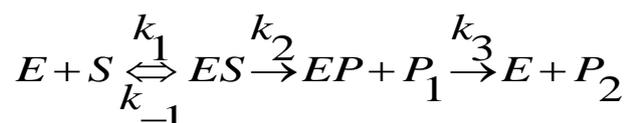


Рис. 5. Схема катализа α -химотрипсином. Активация гидроксильной группы серина (Ser 195) и воды осуществляет цепь переноса протона с участием имидазола и карбоксильной группы. (Варфоломеев и др., 2000).

Кинетика катализа сериновых протеаз. В случае трипсина и химотрипсина механизм классической ферментативной реакции характеризуется следующими трехстадийными элементами реакции с соответствующими константами скоростей процессов: образования фермент-субстратного комплекса k_1 , распада комплекса k_{-1} ($K_s = k_{-1}/k_1$); процесса ацилирования фермента k_2 и его деацилирования k_3 :



где, традиционно, символом E обозначен фермент, символами S - субстрат, ES - фермент-субстратный комплекс, EP - ацилферментный комплекс, P₁ и P₂ – продукты ферментативной реакции на стадии образования ацил-фермента и его гидролиза соответственно. Каталитическая константа (k_{cat}) и константа Михаэлиса (K_M) определяются как:

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3},$$

$$K_M = \frac{k_3(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_2 + k_3)},$$

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1}} = \frac{k_2}{k_3}.$$

В зависимости от строения субстрата, как было показано на α -химотрипсине, скорость лимитирующей стадией может являться либо образование ацил-фермента (k_2 , амидные и нитроанилидные субстраты), либо его распад (k_3 , эфирные субстраты) (Беляева и др., 2002). Кинетический анализ субстратной специфичности говорит о том, что механизм действия трипсина и химотрипсина сходен на всех стадиях ферментативной реакции. Это сходство имеет не только качественный, но и количественный характер. Различия в субстратной специфичности трипсина и химотрипсина обусловлены образованием ионной связи между катионной группой боковой цепи

специфических субстратов трипсина и анионной группой остатка Asp-189 активного центра фермента в реакции ацилирования (Клесов, 1977; Hedstrom, 2002). Сериновые протеазы, возможно, наиболее полно изученные ферментные системы. Специфичность и катализ этих ферментов не просто контролируются несколькими остатками активного центра, а скорее являются свойством всей структуры белка, которая управляется с помощью распределения заряда по сети водородных связей. Таким образом, использование сериновых протеаз предоставляет исключительную возможность протестировать на практике различные идеи и предположения.

1.2. Модификация структуры и активности сериновых протеаз низкомолекулярными лигандами и свойствами микроокружения

В природе белки функционируют вместе с остальными компонентами живой материи в составе тех или иных надмолекулярных ансамблей, которые являются основой молекулярной организации биологических систем. Такие системы играют важную роль во многих биологических процессах (транспорт белков, биосинтез и т.д.) (Поглазов, 1996; Lyubarev, Kurganov, 1996). Изменение свойств микроокружения, регуляция каталитической активности и стабильности ферментов часто осуществляются благодаря образованию надмолекулярных ансамблей, включающих вещества различной природы, например низкомолекулярных лигандов.

Введение добавок в реакционную среду. Данный подход относится к наиболее мягким способам воздействия на ферменты. При этом добавки вносят как непосредственно в реакционную среду, так и в препараты ферментов при приготовлении различных систем. Существенные результаты были получены в случае суспензий биокатализаторов, например при использовании ряда неорганических солей (Khmelnitsky et al., 1994), краун-эфиров (Engbersen et al.,

1994) и спиртов (Kudryashova et al., 1997; Гладилин, Левашов, 1998; Simon et al, 2001; Lu Zh et al, 2002). В работах по исследованию влияния алифатических спиртов на реакции, катализируемые химотрипсином, показано, что спирты выступают в качестве нуклеофилов, конкурирующих с действием воды на стадии деацилирования промежуточного ацилфермента (Мартинек и др., 1970). В работах Кудряшовой (2002 год) был предложен метод стабилизации ферментов путем нековалентного комплексообразования с полиэлектролитами. Суть подхода заключалась в многоточечном креплении каталитически активной конформации за счет электростатического взаимодействия противоположно заряженных групп химотрипсина и полиэлектролита (Кудряшова и др., 2002) и комплексообразование α -химотрипсина с полиэлектролитами приводило к двум основным эффектам: расширению интервала концентраций полярных растворителей, в котором фермент сохранял каталитическую активность, и активации фермента при умеренном содержании растворителя (рис. 6).

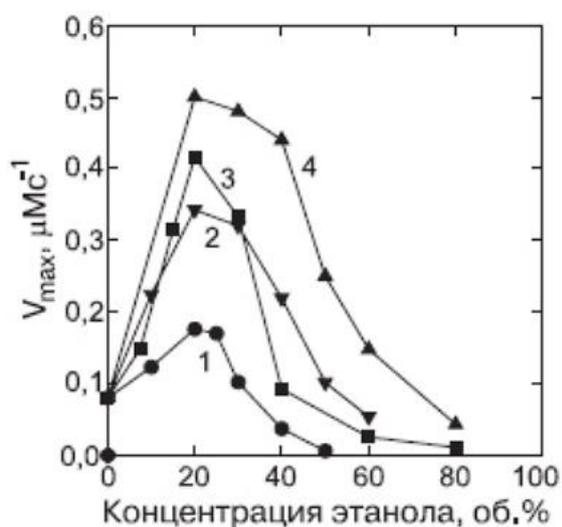


Рис. 6. Зависимость каталитической активности свободного α -химотрипсина (1) и химотрипсина в комплексе с олигоаминами различной длины цепи (2-4) в реакции гидролиза *p*-нитроанилида *N*-бензоил-*L*-тирозина от концентрации этанола в системе вода-этанол. химотрипсин-путресцин (2); химотрипсин – спермидин (3); химотрипсин – спермин (4) (Кудряшова и др., 2002).

Впоследствии было установлено, что стабилизационный эффект наблюдается для ферментов разных классов и широкого круга полярных растворителей; величина стабилизационного эффекта практически не зависит от степени полимеризации электролита, плотности заряда и его химической природы.

Сериновые протеазы в средах, содержащих органические растворители. Первые исследования свойств белков в водно-органических средах были предприняты еще в начале двадцатого века, но интерес к ферментативному катализу в неводных средах наиболее проявился к 80 годам. Растворители так же представляли интерес в качестве инструмента исследования стабильности белков в водных растворах (Zaks, 1988; Klibanov, 1989). Было выпущено большое количество статей по влиянию органических растворителей на структурные свойства белков, в том числе сериновых протеаз (Гладилин, Левашов, 1998; Klibanov, 2001; Castro et al., 2003; Gupta et al., 2004). Оказалось, что очень небольшое число ферментов проявляют хотя бы минимальную активность в растворе с большим содержанием органического компонента. Например, трипсин сохраняет активность в 80% диоксане (Singer, 1962), химотрипсин – в 80% метаноле, пероксидаза хрена – в 70% диметилформамиде (Халгаш, 1991). В большинстве случаев постепенное увеличение содержания органического компонента в растворе приводит к значительным изменениям в структуре белка (Родионова и др., 1987; Нарижнева и др., 1998; Mozhaev et al., 1989; Khmel'nitsky et al., 1991).

Работы по изучению каталитической активности α -химотрипсина в широком концентрационном диапазоне водно-ацетонитрильных смесей показали (Tomíuchi et al., 1993), что фермент сохраняет способность функционировать в двух областях: в областях высокого и низкого содержания воды (рис. 7).

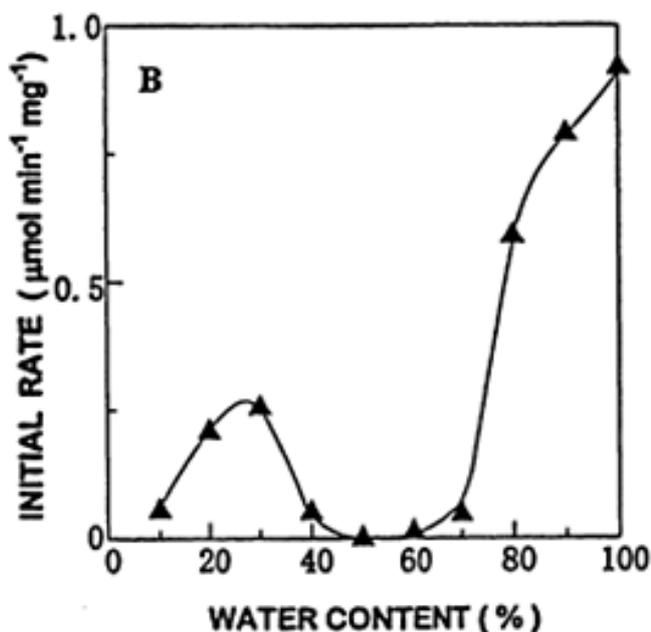


Рис. 7. Начальные скорости реакции гидролиза АТЭЕ α -химотрипсином в водно-ацетонитрильных смесях в зависимости от содержания воды (Tomiiuchi et al., 1993).

Работы (Беляева и др., 2002) по изучению кинетического поведения α -химотрипсина в реакции гидролиза N-ацетил-L-тирозина в смесях вода-диметилсульфоксид и вода – этанол показали, что для обоих растворителей реализовались схожие специфические взаимодействия с активным центром фермента. Изменение структуры активного центра фермента в результате взаимодействия с органическим растворителем вызывает два параллельных эффекта – промотирование стадии образования ацил-фермента и торможения стадии деацилирования.

Сопоставление скорости гидролиза химотрипсином специфического субстрата этилового эфира N-ацетил-L-триптофана (АТЭЕ) и полученных данных флуоресценции показало, что активность изменяется в обратном отношении к уровню доступности его внутренних хромофоров молекулам органического растворителя. Аналогичные результаты были получены и для субтилизинов двух разных видов в средах различной полярности (Kijima et al., 1994).

Исследования по влиянию различных концентраций (20-95%) органических растворителей (этанол, 1,4-диоксан, ацетонитрил) на химотрипсин и трипсин из поджелудочной железы быка показали (Simon et al., 2001) изменения во вторичной структуре белков. Существенные изменения в спектрах КД были найдены для обоих ферментов при различных концентрациях органического растворителя. При повышении концентрации органического растворителя трипсин демонстрировал более высокую стабильность, чем химотрипсин во всех органических растворителях.

Нестабильность ферментов в органических растворах сильно ограничивает их практическое применение. В этой связи разработаны другие способы использования каталитических возможностей ферментов в неводных средах, например: в микроэмульсиях, стабилизированных ПАВ.

Сериновые протеазы в средах содержащих алкилоксибензолы. Одной из широко используемых групп биологически активных веществ, способных оказывать влияние на активность ферментов, являются микробные низкомолекулярные ауторегуляторы (факторы d1- аутоиндукторы анабиоза) - алкилоксибензолы (АОБ). Антимикробная активность алкилбензолов находит свое применение в медицине и в качестве биомаркеров (Landberg et al., 2009; Andersson et al., 2010). Короткоцепочечные алкилоксибензолы (C1–C6) проявляют антиоксидантную активность (Hladyszowski et al., 1998; Kozubek, Tuman, 1999). Известно (Ильинская и др., 2002; Степаненко и др., 2004; Степаненко и др., 2005), что АОБ оказывают защитное действие на клетки бактерий и дрожжей в условиях температурного шока, окислительного стресса, на клетки млекопитающих в присутствии химических и биологических токсикантов. Благодаря этому они могут играть роль естественных структурных модификаторов ферментов. Химические свойства АОБ определяют их способность к нековалентным взаимодействиям с биологическими молекулами и надмолекулярными структурами (мембранами) за счет образования межмолекулярных водородных связей, электростатических

и гидрофобных взаимодействий, которые могут приводить к изменению функциональной активности ферментов. Показано, что действие алкилоксибензолов на различные ферменты (трипсин, лизоцим и др.) зависит от их концентрации, времени воздействия и структуры. Например, метилрезорцин продемонстрировал способность увеличивать активность ферментов на 150–400% (Мартиросова и др., 2004; Николаев и др., 2008), а гидрофобный гексилрезорцин, в зависимости от концентрации, может выступать как активатор, так и в качестве ингибитора ферментативной активности (Петровский и др., 2009). Также показано (Ross et al., 2004), что алкилрезорцин связывается с трипсином, в результате чего происходит понижение активности сериновой протеазы. Обнаружено, что АОБ участвуют в модификации структуры ферментов с образованием комплексов, обладающих повышенной устойчивостью к денатурирующим воздействиям (фотоокислению, температуре, pH) (Колпаков и др., 2000; El-Registan et al., 2005). Амфифильные молекулы АОБ способны образовывать мицеллярные агрегаты, что, в свою очередь, оказывает значительное влияние на функционирование ферментов (Мартиросова и др., 2014). Например, активность лизоцима ингибируется полностью, когда плотная мицеллярная структура, образованная при больших концентрациях АОБ, затрудняет доступ субстрата к ферменту (Николаев и др., 2008).

1.3. Супрамолекулярные системы на основе амфифильных соединений

Ассоциация амфифильных молекул (поверхностно-активных веществ) имеет большое значение в живом мире, например, ассоциаты фосфолипидов образуют клеточные мембраны, а сыворотка крови – смесь человеческого сывороточного альбумина со многими составляющими, включают в себя низкомолекулярные ПАВ (Wu et al., 2007). Интенсивное изучение таких систем связано с возможностями решения различных проблем в пищевой,

косметической, фармацевтической областях промышленности. Большое внимание уделяется решению таких вопросов биотехнологии как, организация адресной доставки лекарственных препаратов в определенное место организма с их контролируемым высвобождением, создание необходимой среды для химических реакций, моделирование природной иммобилизации биомакромолекул, создание нанореакторов и наноконтейнеров (Martinek et al., 1989; Stamatis et al., 1999; Chang et al., 2000; Левашов, Клячко, 2001; Tonova, Lazarova, 2008; Wei et al., 2009; Kedar et al., 2010; Mir et al., 2010; Otzen, 2011). Интерес к таким системам веществ вызван двумя их важными характеристиками: способностью к агрегации в растворе выше определенной концентрации, которая называется критической концентрацией мицеллообразования (ККМ), а также способностью к солюбилизации в отношении органических соединений и биологических веществ.

1.3.1. Поверхностно-активные вещества (ПАВ)

Фундаментальной характеристикой мицеллообразующих мономеров является их дифильность (амфифильность), т.е. наличие в одной и той же молекуле ПАВ гидрофильной и гидрофобной частей, причем, как правило, размеры полярной головной группы существенно меньше размеров гидрофобного радикала (Fendler et al., 1970; Миттел, 1980; Rosen, 1989; Rangel-Yagouï et al., 2005). Наиболее яркими дифильными свойствами обладают молекулы поверхностно-активных веществ (ПАВ).

Важнейшей классификацией ПАВ является классификация по ионогенным свойствам гидрофильных групп, в этом случае ПАВ подразделяются на следующие группы (Миттел, 1980; Tadros., 1984):

- катионные ПАВ (катионоактивные) – диссоциируют в воде с образованием поверхностно-активного катиона. К ним относят соли

алифатических или ароматических первичных, вторичных и третичных аминов и аммониевых оснований;

- анионные ПАВ (анионоактивные) – диссоциируют в воде с образованием поверхностно-активного аниона. К ним относятся соли карбоновых кислот или мыла, соли желчных кислот, акрилсульфаты и арилсульфаты;
- амфотерные ПАВ (амфолитные) – это алкиламинокислоты RNH_2COOH , сульфобетаины, содержат несколько полярных групп и способны давать при диссоциации поверхностно-активные анионы или катионы в зависимости от внешних условий (прежде всего от значения рН в водном растворе);
- неионные ПАВ (неионогенные) – которые не диссоциируют в воде на ионы. К ним относят оксиэтилированные спирты и жирные кислоты (твины).
- цвиттер-ионные ПАВ, полярные группы которых являются цвиттер-ионами.

Ионные ПАВ всегда связаны с противоионами, и их свойства значительно зависят от природы противоионов (Миттел, 1980; Ланге, 2005; Joshi et al., 2002).

Несмотря на то, что в основе строения молекул ПАВ лежит принцип амфифильности, гидрофобная часть может состоять из одного углеводородного радикала, а может иметь в своем составе до четырех углеводородных цепей, т.е. они могут составлять множество комбинаций, исходя из типа, количества и размера функциональных групп. Иногда гидрофобная часть содержит ненасыщенные или ароматические фрагменты и может быть полностью или частично галогенирована, как, например, в случае фторуглеродных ПАВ, она может иметь разветвленную структуру, состоять из двух или более цепей.

Дифильные молекулы имеют тенденцию собираться на поверхностях раздела, где гидрофобные группы частично или полностью изолируются от воды, а гидрофильные группы остаются погруженными в воду. Этой общей тенденцией объясняется их поверхностная активность, т.е. способность

адсорбироваться на границе раздела воздух/вода или масло/вода и смачивать поверхности гидрофобных твердых веществ, таких, как углерод, или связываться с макромолекулами типа белков (Starov et al., 2010). Та же двойственная тенденция, основанная на асимметричном строении молекул, обеспечивает образование структур типа мыльных пленок и бимолекулярных слоев. При образовании липидных мембран участвуют те же силы и те же структурные особенности молекул (Миттел К., 1980).

Геминальные ПАВ. В последние десять лет наблюдается всплеск интереса к дикаатионным (геминальным) ПАВ. Геминальные ПАВ представляют собой новое поколение ПАВ. Они состоят из двух головных групп, ковалентно соединенных спейсерным “мостиком” различной длины и строения, и двух гидрофобных углеводородных радикалов (рис. 8). Они содержат полиметиленовые спейсерные фрагменты и обозначаются как n - m - n , где n – это число углеродных атомов в углеводородном радикале, а m – количество метиленовых групп в спейсере (Couderc, Toulles, 2001; Omakor et al., 2001; Sekhon, 2004; Han et al., 2006; Terrier et al., 2006; Mondal et al., 2015). Интерес обусловлен тем, что они демонстрируют целый ряд преимуществ по сравнению с их мономерными аналогами: высокая вязкоэластичность, способность сильнее снижать поверхностное натяжение на границе раздела масло-вода. Они обладают более высокой солюбилизационной емкостью и характеризуются разнообразной морфологией образуемых агрегатов (Gull et al., 2009). Геминальные ПАВ характеризуются выраженным мицеллярным каталитическим эффектом, который проявляется при более низких концентрациях, чем у их мономерных аналогов (Kabir-ud-Din, Siddiqui, 2009; Wang et al., 2014; Roy et al., 2015). ККМ геминальных ПАВ на порядок ниже, чем у их мономерных аналогов (Симаненко и др., 2004; Domingos et al., 2004; Kumar et al., 2004).

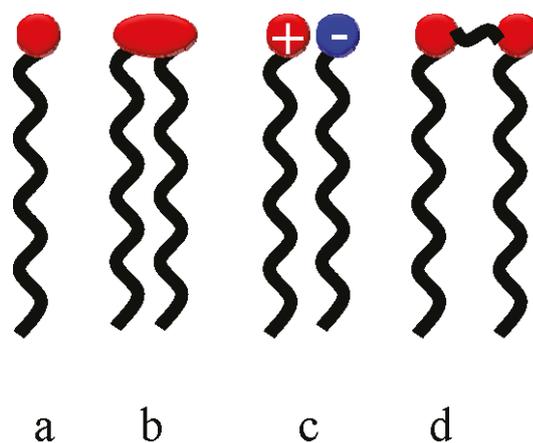


Рис. 8. Схематическое изображение различных амфифильных молекул: (a) мономерные, (b) липидные, (c) непарно-ионные, (d) геминальные (Bhattacharya et al., 2010).

Свойства систем на основе геминальных ПАВ зависят от их структуры и концентрации. Исследовано (Ghosh et al., 2008) влияние природы и структуры спейсера, соединяющего две полярные головные группы дикатионных ПАВ и показано, в геминальных ПАВ n - m - n значения ККМ максимальны при $m = 5$ или 6 для амфифилов с гидрофобным полиметиленовым спейсером, и увеличиваются с ростом числа этиленоксидных фрагментов для гидрофильных поли-(этиленоксидных) спейсеров. Известно (Bai et al., 2002; Chen et al., 2006; Kumar, 2015), что спейсерный фрагмент оказывает влияние на многие свойства геминальных ПАВ: ККМ, ориентацию ПАВ на границе раздела воздух/вода и конформацию молекул в водных растворах и т.д. В зависимости от длины спейсера геминальные ПАВ могут образовываться трубчатые, червеобразные мицеллы, многослойные структуры, гексагональные фазы, спиральные ленты или удлиненные везикулы. В последнее время в некоторых работах также используют смеси геминальных ПАВ с ПАВ для создания систем с заданной структурой и необходимыми функциями (Villa et al., 2013; Ji et al., 2016).

Благодаря тому, что связывание ПАВ с белками может либо стабилизировать структуры этих белков, либо привести к денатурации, появляется все больше работ по исследованию взаимодействия белок-ПАВ. До сих пор многие исследователи были сосредоточены на взаимодействии белков с

традиционными ПАВ (ДСН, ЦТАБ и др.), тем не менее, существуют относительно небольшое число исследований систем белок-ГПАВ (Wang et al., 2009; Tai et al., 2014; Mondal et al., 2016). Например, в работе (Li et al., 2006) показано, что катионный ГПАВ может стабилизировать вторичную структуру бычьего сывороточного альбумина при низких концентрациях поверхностно-активного вещества, в то время как соответствующий мономерный ЦТАБ не показывает такого эффекта. Исследования различных научных групп (Li et al., 2006; Wu et al., 2007; Pi et al., 2006; Gull et al., 2009; Han et al., 2010) демонстрируют, что геминальные ПАВ более эффективно взаимодействуют с пептидами и белками и денатурируют их при более низких концентрациях, по сравнению с традиционными ПАВ.

Поэтому один из разделов работы посвящен исследованию систем белок-ГПАВ при варьировании природы головной группы, длины спейсерного фрагмента и углеводородного радикала.

1.3.2. Мицеллярные растворы

Показателем эффективности ПАВ служит гидрофильно-липофильный баланс, при котором силы гидрофильных и липофильных взаимодействий молекулы со средой оптимально соотносятся для успешного образования ассоциатов в растворе (Ланге, 2005). Практически все амфифильные молекулы ПАВ, находящиеся в дисперсной среде, образуют коллоидные агрегаты (мицеллы). По мере увеличения концентрации и химического потенциала ПАВ взаимодействие между молекулами в растворе усиливается. При достижении ККМ ПАВ, в растворе образуются мицеллы – компактные, термодинамически устойчивые агрегаты (Rosen, 1989; Rangel-Yagui et al., 2005). Значение ККМ определяется выигрышем в энергии Гиббса молекул ПАВ в мицелле, по сравнению с мономерным состоянием, которое характеризуется установлением баланса между двумя конкурирующими эффектами (энтальпийным и

энтропийным). С ростом концентрации ПАВ выше ККМ, наблюдается линейное увеличение мицелл в растворе. При дальнейшем увеличении концентрации ПАВ возрастает взаимодействие между мицеллами, что может приводить к изменению формы мицелл и фазовым переходам. Значения ККМ для различных ПАВ лежат в интервале 10^{-8} до 10^{-1} М.

Мицеллы образуются и в водной (прямые мицеллы) и в масляной (обратные или обращенные мицеллы) средах (рис. 9). Радиус сферы или цилиндра в них сравним с размером молекулы амфифила (Русанов, 1992).

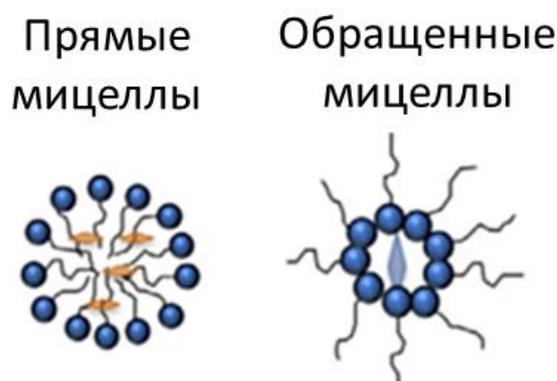


Рис. 9. Примеры некоторых коллоидных систем (Joye et al., 2014).

Образование мицелл обычно отражается в изменении кривой зависимости того или иного физического свойства раствора от концентрации ПАВ, а именно: поверхностного натяжения, прочности, вязкости, теплоемкости, спектральных свойств, электропроводности и т.д. (Reis et al., 2004; Stanley et al., 2009; Jumpertz et al., 2011; Zdziennicka et al., 2012). На величину ККМ оказывают влияние целый ряд факторов: природа ПАВ, степень разветвления углеводородного радикала, кислотность среды, солевой фон, наличие органических растворителей и других частиц органической природы (Захарова и др., 2002; Di Michele et al., 2011). Как уже упоминалось ранее, важную роль играет гидрофильно-липофильный баланс соединения. Чем длиннее алкильный радикал и менее полярна гидрофильная группа, тем ниже значение ККМ.

Наличие в молекуле полярных групп и двойных связей приводит к росту значений ККМ. ККМ, также, определяется положением ионогенных групп в гидрофобном радикале, их смещение от края к середине цепи сопровождается увеличением ККМ. Снижение ККМ в мицеллярном растворе наблюдается при увеличении содержания электролита или заряда противоиона, что уменьшает заряд мицеллы, снижает отталкивание головных групп и способствует мицеллообразованию. Значительное снижение ККМ наблюдается при введении в молекулу ПАВ органического противоиона (Romsted, 1984; Савин и др., 1991).

Известно (Миттел, 1980), что в мицеллярном растворе образуются разные типы мицелл в зависимости от концентрации ПАВ. Если концентрация ПАВ не превышает величину ККМ более чем на 2 порядка, в мицеллярном растворе наблюдается образование сферических мицелл. При увеличении концентрации ПАВ сферические мицеллы изменяются, образуя цилиндрические или слоистые (пластинчатые) мицеллы. В образующихся бимолекулярных слоях углеводородные радикалы направлены внутрь слоев, а полярные группы размещаются снаружи (Fendler et al., 1987; Савин и др., 1991).

Мицеллы в водной среде характеризуются следующими элементами: углеводородное ядро; водно-углеводородный слой, толщина которого соответствует глубине проникновения молекул воды внутрь углеводородной части мицеллы (составляет примерно 2-3 CH_2 – фрагмента); слой гидратированных полярных головных групп; неоднородный слой раствора, который прилегает к мицелле и выступает в роли диффузионной части двойного электрического слоя (Миттел, 1980).

1.3.3. Микроэмульсии

Микроэмульсии – это системы, содержащие сферические агрегаты масла или воды, диспергированные в другой жидкости и стабилизированные

поверхностным натяжением пленок одного или более ПАВ, размеры капель малы и находятся в интервале от 5 до 200 нм. Следует отметить, что понятие “микроэмульсия” очень близко понятию “мицелла”, граница между ними достаточно размыта (Миттел, 1980). Микроэмульсии чаще применяют в различных областях химии и инженерии. Следует также отметить широкое применение микроэмульсий различного типа в медицине и фармацевтике, где они выступают в качестве агентов для доставки лекарственных средств и в косметической и пищевой промышленности. (Spernath, Aserin, 2006; Muzaffar et al., 2013; Ahammed et al., 2013). Особый интерес вызывает применение микроэмульсий в биотехнологии и для проведения биоорганических процессов с участием ферментов, которые в этих системах обнаруживают стабильность и высокую активность (Березин, 1985; Клячко и др., 1990; Flanagan, Slingh, 2006; Das et al., 2014). Следует отметить, что многие ферменты, в том числе липаза, эстераза, дегидрогеназа и оксидаза, которые являются гидрофобными по природе, в живых организмах функционируют именно в организованных системах, какими являются клеточные мембраны и субклеточные частицы, поэтому микроэмульсии являются удобной моделью, позволяющей *in vitro* выявлять особенности процессов, происходящих в живой клетке.

Большинство микроэмульсий являются аналогами прямых, либо обратных мицеллярных систем, но помимо этого могут содержать дополнительный компонент, например, соли или со-ПАВ (Friberg, Bothorel, 1987; Paul et al., 1997). Соли добавляются для воздействия на упругость поверхностных пленок ПАВ. Со-ПАВ представляют собой органические молекулы (например, низкомолекулярные спирты), в большинстве случаев, амфифильные, которые, как и в случае добавления солей влияют на упругость. При их добавлении увеличивается количество дисперсной фазы жидкости, стабилизированной в микроэмульсии (Ланге, 2005).

Как уже упоминалось выше, диаметры капель малы от 5 до 200 нм, в большинстве случаев от 10 до 60 нм. В этой области значений диаметров капель микроэмульсии являются моодисперсными и благодаря малым

размерам прозрачны. Обычно микроэмульсии состоят из четырех компонентов: воды, масла, ионного ПАВ и спирта, но в некоторых случаях используется подходящее неионогенное ПАВ. Образование микроэмульсии происходит самопроизвольно, это говорит о ее термодинамической стабильности. Объемная доля дисперсной фазы может варьироваться в широких пределах от 20 до 80%. Молекулярная масса дисперсной фазы больше молекулярной массы большинства мицелл, содержащих солюбилизированные вещества, что позволяет получать очень большие отношения растворенного вещества к растворителю.

Фазовое поведение микроэмульсионной системы, состоящей из трех компонентов (масло/вода/ПАВ) может быть изучено с помощью тройной фазовой диаграммы (рис. 10).

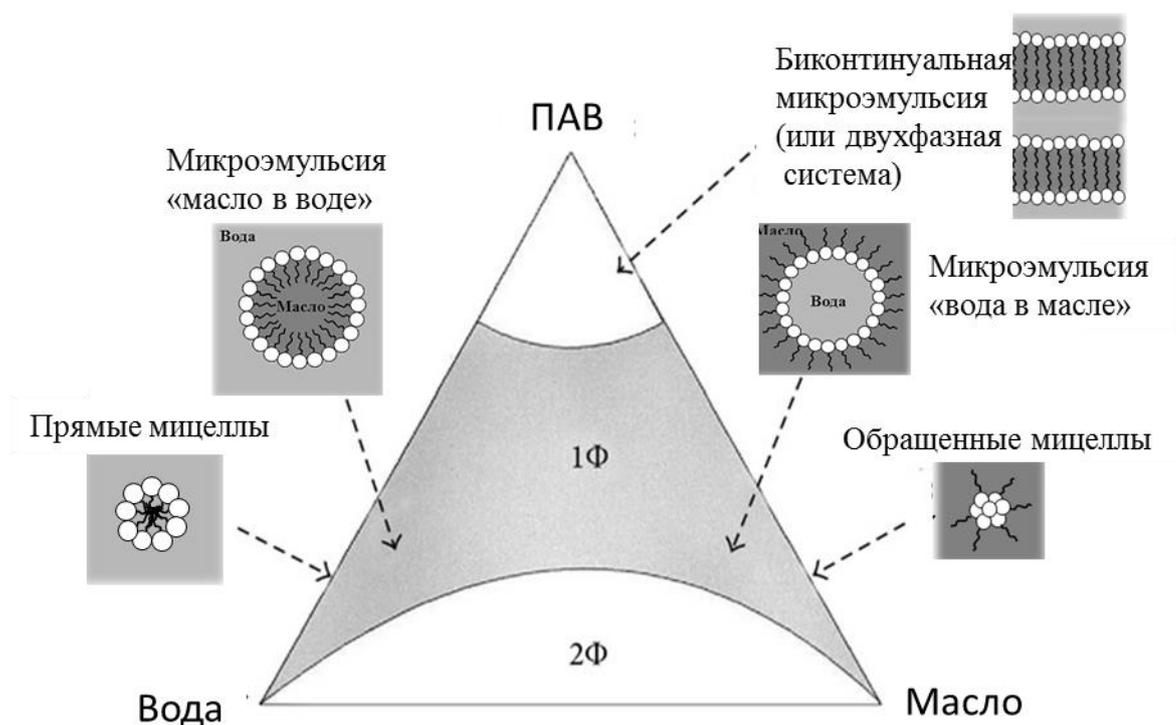


Рис. 10. Схематическая диаграмма фазового состояния системы вода/ПАВ/масло; каждый угол соответствует 100% концентрации компонента (Lawrence, Rees, 2000).

Существуют три основных вида микроэмульсий, монодисперсная система масло в воде (прямая микроэмульсия), вода в масле (обращенная микроэмульсия) и биконтинуальная система (несмешивающиеся фазы разделены мономолекулярным слоем ПАВ). Во всех видах микроэмульсий поверхность раздела фаз стабилизируется сочетанием ПАВ и со-ПАВ (Acharya, Hartley, 2012; Sarkhejiya et al., 2013).

Обращенные мицеллы и микроэмульсии представляют собой уникальные системы для исследования функциональных свойств ферментов. В них можно максимально естественно моделировать природную иммобилизацию ферментов и их микроокружение. Система позволяет достаточно легко модифицировать локальное микроокружение фермента. Вместе с тем нельзя забывать, что система «фермент-обращенная мицелла» представляет собой единую каталитическую композицию. Во-первых, мицеллярная матрица активно воздействует на молекулу фермента, изменяя его свойства и каталитическую активность. Во-вторых, именно мицеллярная матрица обеспечивает предреакционную подготовку субстрата и во многом определяет проявление субстратной специфичности фермента. И, в-третьих, всегда существует «обратная» взаимосвязь – модификация структуры и других физико-химических свойств реакционной среды под действием солюбилизованных реагентов.

1.3.4. Солюбилизация

Важнейшим свойством систем с ПАВ является их способность солюбилизовать различные вещества. При солюбилизации воды в растворах ПАВ в органических растворителях образуются гидратированные (обращенные) мицеллы. Они по форме и размерам отличаются от мицелл в безводных системах. Гидратация мицелл приводит к увеличению их молекулярной массы, размера и они приобретают почти сферическую форму

(Stamatis et al., 1999). Такая вода, заполняющая внутреннюю полость обращенных мицелл, отличается от обычной воды по своим физико-химическим свойствам и различия определяются степенью гидратации обращенных мицелл $[H_2O]/[ПАВ]$ (W_0). Так называемая свободная вода появляется в обращенных мицеллах после завершения гидратации ПАВ (Stamatis et al., 1999). Поэтому солюбилизация веществ в микрофазе системы может существенно изменять их гидрофобные свойства, конформацию молекул, гидратацию и вследствие этого их физико-химические свойства (Zaheer, Raiuddin 2009). Субстрат в мицелле может удерживаться за счет водородных связей и сил гидрофобного и электростатического взаимодействия. Одним из важнейших вопросов в изучении солюбилизации является вопрос о его локализации в мицелле. Выделяют несколько способов солюбилизации субстрата в мицеллах (Миттел, 1980; Rangel-Yagui et al., 2005), которые зависят от соотношения гидрофильных и гидрофобных свойств реагента и от вероятности химических взаимодействий. Субстрат может находиться в ядре мицеллы, на поверхности и располагаться радиально, т.е. неполярная группа в ядре мицеллы, а полярная группа на поверхности, в случае неионных ПАВ в полиоксиэтиленовом слое.

Процесс солюбилизации протекает в две стадии: быстрая и более медленная. Первая обусловленная адсорбцией субстрата на поверхности, вторая связана с проникновением в ядро мицеллы и ориентацией внутри мицеллы. (Миттел, 1980).

Для количественного исследования солюбилизации использую такие величины как, коэффициент распределения вещества между мицеллярной псевдофазой и объемом растворителя (P), молярную солюбилизационную емкость (χ) и константу связывания реагента с мицеллами ПАВ (Bunton, Savelli, 1986; Rangel-Yagui et al., 2005). Изменение микроокружения субстрата в мицеллярных системах, по сравнению с таковым в водном растворе является одним из важных факторов солюбилизации, изменяются физико-химические свойства субстрата, конформация, подвижность, характер электронного

переноса (Совин, 1991), его реакционная способность (Bunton, Savelli, 1986) и кислотно-основные свойства (Миргородская и др., 2006; Rottman, Anvir, 2001). Прежде всего, это связано с полярностью мицеллярной фазы и низкой диэлектрической проницаемостью. Еще одним важным фактором солюбилизации является накопление вещества в мицелле, концентрация реагентов может достигать несколько порядков, и ориентация реагентов (Kunishima et al., 2012; Nakahara et al., 2014). Таким образом, эти эффекты оказывают влияние на кинетику химических реакций в мицеллярных средах.

1.4. Свойства сериновых протеаз в супрамолекулярных системах на основе амфифильных соединений

Взаимодействия белков с амфифильными соединениями являются предметом многолетнего интереса исследователей (Luisi et al., 1988; Valstar et al., 2000; Klyachko et al., 2003; Honda et al., 2004; Wangsakan et al., 2004; Ghohs, Dey, 2015). В основе лежит желание получить биологические структуры с заданными свойствами, т. е. возможность управления организацией таких структур и понимание особенностей взаимосвязи между: строением и свойствами веществ; строением молекул или иных частиц и принципом их взаимной упаковки – ассоциации. Механизм взаимодействия белок-амфифил зависит от природы и концентрации самого амфифильного соединения (McClellan, Franses, 2003; Santos et al., 2003; Kelley, McClements, 2003; Otzen, 2011). В некоторых публикациях говорится об эффективном катализе сериновыми протеазами в различных микроэмульсионных средах (Клячко и др., 1990; Celej et al., 2004). Согласно работе Клячко и др., (1990 г.) зависимость каталитической активности α -химотрипсина от степени сольватации ПАВ имеет колоколообразный вид, причем оптимум каталитической активности солюбилизированных в таких системах ферментов наблюдается у условиях

геометрического соответствия размеров внутренней полости мицеллы молекуле белка (рис. 11).

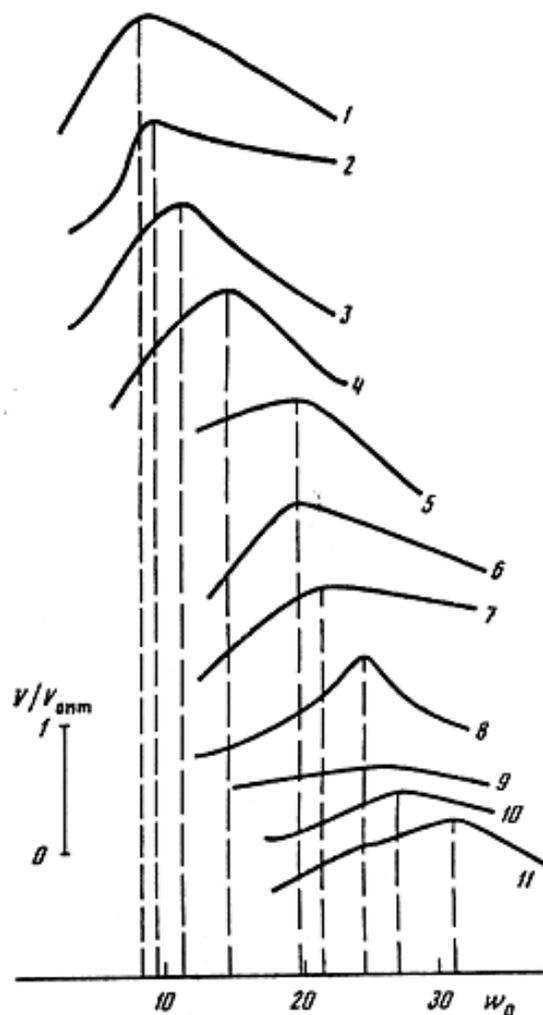


Рис. 11. Сравнительная каталитическая активность ферментов, солюбилизированных в обращенных мицеллах, стабилизированных АОТ. 1 – цитохром с, 2 – α -химотрипсин, 3 – липаза, 4 – пероксидаза, 5 – простагландин-Н-синтетаза, 6 – кислая фосфатаза, 7 – липоксигеназа, 8 – лакказа, 9 – щелочная фосфатаза, 10 – каталаза, 11 – алкогольдегидрогеназа (Клячко и др., 1990).

Увеличение активности фермента при соответствии размеров внутренней полости мицеллы размерам белка объясняется «вязкотропной регуляцией» реакционной способности фермента его микроокружением (Котрикадзе и др., 1999). При снижении доли воды в водно-органической смеси уровень оптимальной каталитической активности ферментов существенно

увеличивается и сдвигается в область меньшей гидратации мицелл (рис. 12) (Клячко и др., 1990).

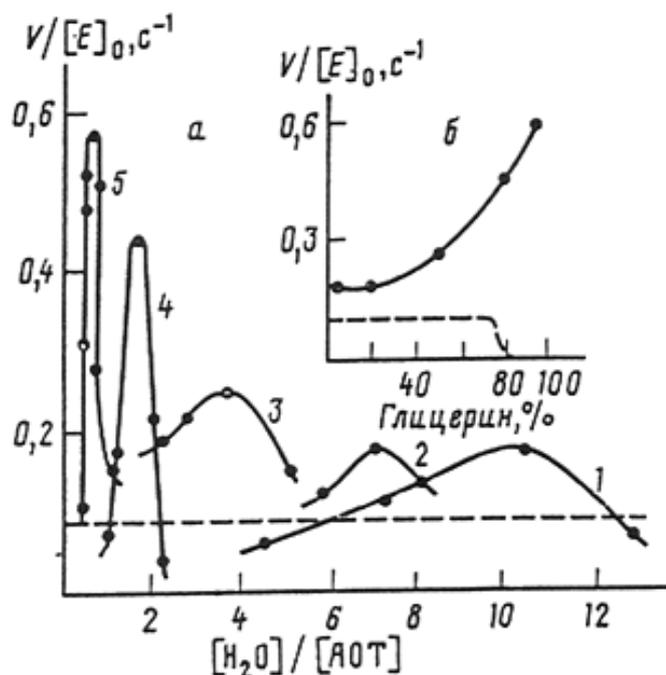


Рис. 12. Зависимость максимальной скорости реакции катализируемой α -химотрипсином; а – от W_0 при объемных соотношениях вода/органический растворитель (глицерин) 1/0 (1), 4/1 (2), 1/1 (3), 1/4 (4) и 3/47 (5); б – от процентного содержания глицерина в системе АОТ/вода-глицерин/октан. Штриховой линией показаны значения скоростей в водном растворе (Клячко и др. 1990).

В микроэмульсионных системах на основе додецилсульфата натрия (ДСН) с глобулярным белком, трипсином, изучены физико-химические свойства в водной среде (Ghosh, Banerjee, 2002). Показано, что агрегаты ДСН-трипсин образуются при концентрациях ПАВ выше ККМ. Наблюдается увеличение вязкости для системы ДСН-трипсин, а также уменьшение числа агрегации и полярности интерфейса по сравнению со значениями для ДСН мицелл без белка. Спектры КД демонстрируют высокое содержание α -спиралей и разворачивание структуры трипсина в присутствии ДСН за счет электростатического отталкивания (Ghosh, Banerjee, 2002).

Увеличение каталитической активности α -химотрипсина в мицеллярной системе ЦТАБ, по сравнению с водным раствором связывают не только с распределением субстрата между водной и мицеллярной фазой, но и изменениями в структуре белка (Celej et al., 2004). Взаимодействие фермента и ЦТАБ приводит к увеличению максимальной скорости реакции (V_m) и увеличению сродства с субстратом (р-нитрофенилацетатом), что указывает на более высокую каталитическую эффективность связанного α -химотрипсина.

При изучении влияния катионного ПАВ, додецилтриметиламмоний бромида (ДТАБ) на скорость гидролиза 2-нафтил ацетата катализируемого α -химотрипсином показано (Albain et al., 2003), что присутствие ПАВ при концентрациях выше ККМ увеличивает значение константы Михаэлиса (K_M) без существенных изменений в каталитической константе (k_{cat}), что указывает на взаимодействие между ферментом и мицеллой. Это может быть связано с частичным разворачиванием фермента, что подтверждают данные флуоресценции. Результаты представленные в этой работе существенно различаются с результатами полученными при гидролизе N-глутарил-L-фенилаланин п-нитроанилида в ЦТАБ (Alfani et al., 2000; Viparelli et al., 2001), где было обнаружено либо повышение активности α -химотрипсина ниже ККМ ЦТАБ, либо потеря активности в присутствии мицелл. Различия с данными Albain и др. (2003 г.) (отсутствие эффекта ниже ККМ и снижение активности выше ККМ), полученные для 2-нафтил ацетата еще раз подчеркивают чувствительность сериновых протеаз при взаимодействии с субстратом к длине алкильной цепи ПАВ.

Таким образом, в супрамолекулярных системах с амфифильными соединениями следует учитывать возможное изменение конформации фермента при взаимодействии с молекулами или мицеллами ПАВ, а также возможность сольubilизации субстрата ПАВ.

1.5. Постановка цели исследования

Обсуждаемые в литературе механизмы регуляции активности ферментов можно условно разделить на две категории. С одной стороны, наблюдаемые изменения активности белков в микрогетерогенных системах связывают с конформационными изменениями фермента при контакте с поверхностью раздела фаз. С другой стороны, ряд исследователей полагает, что регуляция активности фермента осуществляется за счет модификации коллоидной системы.

Суммируя результаты и факты, изложенные в этой главе, следует отметить, что, несмотря на большое количество научных работ, посвященных проблеме регуляции активности ферментов, вопрос о влиянии низкомолекулярных амфифильных лигандов на стабильность и функциональную активность сериновых протеаз остаётся открытым и находится на стадии накопления фактического материала. Необходимы дальнейшие исследования, опирающиеся не только на данные по активности ферментов, но и учитывающие влияние низкомолекулярных амфифильных лигандов на структуру белка и его микроокружения.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

2.1.1. Ферменты, субстраты

Ферменты: В качестве объектов исследования были выбраны белки с достаточно хорошо изученными свойствами, вторичной и третичной структурой: трипсин из поджелудочной железы свиньи фирмы «Sigma» с молекулярной массой 23800 Да (КФ 3.4.21.4, тип IX-S, Т-0303) и α -химотрипсин из поджелудочной железы свиньи (КФ 3.4.21.1, тип II, С-4129) с молекулярной массой 24800 Да.

Трипсин и α -химотрипсин растворяли в буферном растворе (0.05 М трис-НСl) при рН 7.5. Концентрацию ферментов контролировали на полосе поглощения 283 нм используя коэффициенты поглощения $E^{1\%}_{1\text{см}} = 14$ для трипсина, $E^{1\%}_{1\text{см}} = 20$ для α -химотрипсина (Бреслер и др., 1961).

Субстраты: В качестве субстратов для определения активности трипсина и α -химотрипсина были выбраны их специфические субстраты N- α -бензоил-L-аргинин этиловый эфир (ЭЭБА), N-бензоил DL-аргинин р-нитроанилид (БАПНА) для трипсина и N-бензоил L-тирозин р-нитроанилид (БТНА) для α -химотрипсина (Рис. 13). Концентрация субстратов контролировалась соответственно на полосе поглощения 228 нм (ЭЭБА) (коэффициент экстинкции $\varepsilon = 1100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и 323 нм (БТНА, БАПНА) (коэффициент экстинкции $\varepsilon = 10700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

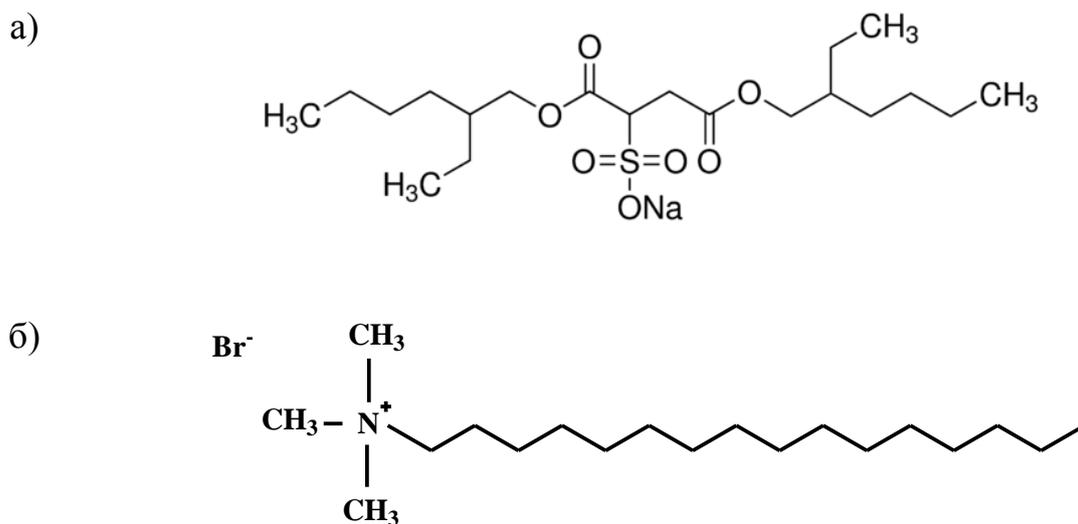


Рис. 14. Структура АОТ (а) и ЦТАБ (б).

Геминальные ПАВ: Дикатионные геминальные ПАВ алкаденил- α,ω -бис(метилдиалкиламмонийбромиды) (ГПАВ):

- $[C_nH_{2n+1}(CH_3)_2N(CH_2)_6N(CH_3)_2C_nH_{2n+1}]^{2+}Br^{2-}$, с метильным заместителем в головной группе, различающиеся длиной углеводородного радикала $n-C_nH_{2n+1}$; где $n = 10, 12, 14, 16$ (в тексте обозначаются как $n=10, 12$ и т.д.);

- $[C_{16}H_{33}(CH_3)(C_2H_4OH)N(CH_2)_mN(CH_3)(C_2H_4OH)C_{16}H_{33}]^{2+}Br^{2-}$, с гидроксиэтильным заместителем в головной группе, различающиеся длиной полиметиленового спейсера $n-(CH_2)_m$; где $m = 6, 8, 10, 12$ (в тексте обозначаются как $m=6, 8$ и т.д.).

Геминальные ПАВ были синтезированы в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова в лаборатории Высокоорганизованных сред по известной методике (Borse et al., 2006; Zakharova et al., 2012). Строение полученных соединений было подтверждено данными ИК- и ЯМР-спектроскопии. В качестве примера на рисунке 15 представлена структурная формула геминальных ПАВ $n=6$ и $m=16$.

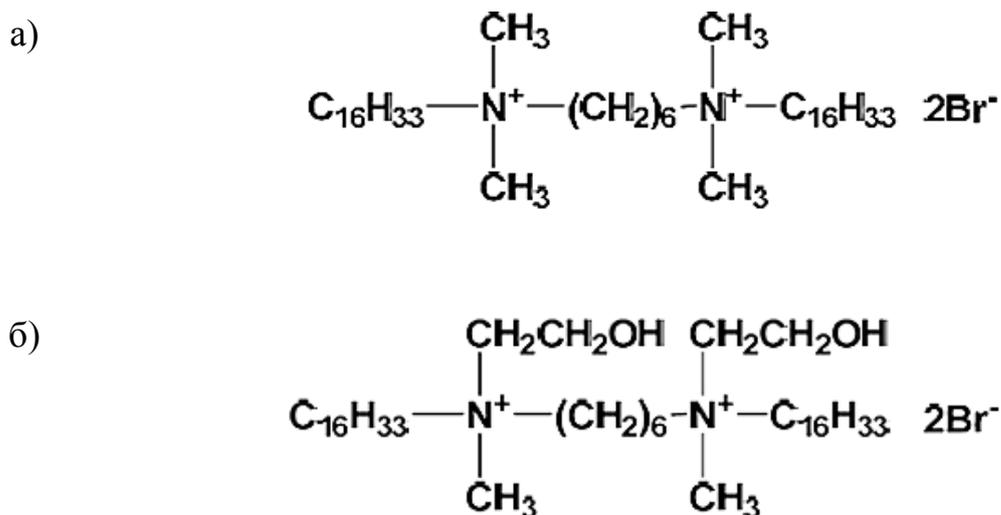


Рис. 15. Структурные формулы: 1,6-гексалиден-бис-(диметилцетиламмоний) бромида (n=6) (а) и 1,6-гексалиден-бис-(гидроксиэтилметилцетиламмоний) бромида (m=16) (б).

Алкилоксибензолы: Алкилрезорцины фирмы «Sigma» различающиеся длиной алкильного радикала (рис. 16): 4-метилрезорцин (C7); 4-гексилрезорцин (C12); додецилрезорцин (C18).

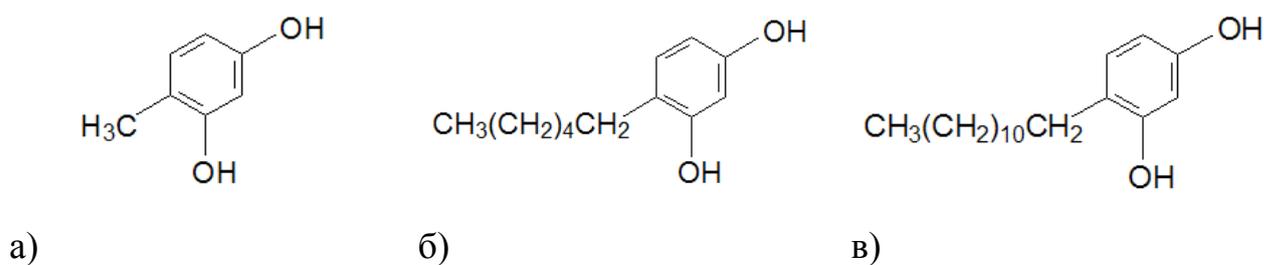


Рис. 16. Структура АОБ: C7 (а), C12 (б) и C18 (в)

Физико-химические характеристики растворов исследуемых ПАВ: Как следует из приведенных данных (глава 1), геминальные ПАВ характеризуются значениями ККМ намного ниже, чем у их одноцепочечных аналогов ЦТАБ (табл. 1). Приведенные в работе результаты по структуре и каталитической активности исследуемых ферментов были выполнены в мицеллярных растворах ПАВ, т.е. существенно выше их ККМ, исключения составляли ГПАВ n=10 и

n=12. Значения ККМ были получены в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН.

Таблица 1. Значения ККМ ПАВ

ПАВ	ККМ, мМ
АОТ	0.73*
ЦТАБ	0.8
ГПАВ (m=6)	0.009
ГПАВ (m=8)	0.0012
ГПАВ (m=10)	0.002
ГПАВ (m=12)	0.0096
ГПАВ (n=16)	0.04
ГПАВ (n=14)	0.17
ГПАВ (n=12)	1.25
ГПАВ (n=10)	6.0

* (Mukherjee et al., 1993; Moulik et al., 1996)

2.2. Приготовление растворов

Для приготовления всех растворов амфифильных соединений использовали 50мМ трис-НСl-буфер рН 7.5 (для АОТ и ЦТАБ рН-8.5). Буферные растворы готовили с использованием бидистиллированной воды.

Приготовление микроэмульсий обращенных мицелл АОТ и ЦТАБ: АОТ и ЦТАБ способны образовывать обращенные мицеллы в различных органических средах и удерживать значительные количества воды. Радиус водного ядра мицелл, R_w , меняется от 15 до 100 Å, что позволяет солюбилизовать молекулы ферментов различного размера. Размер мицелл зависит от величины

W_0 и для систем на основе АОТ и ЦТАБ может быть определен с достаточно высокой точностью (Levashov, Klyachko, 2001).

Микроэмульсии вода/масло готовили путем добавления требуемого количества воды или водного раствора реагента в раствор ПАВ в органическом растворителе. Микроэмульсии на основе катионного ПАВ – ЦТАБ также содержали со-ПАВ. В качестве со-ПАВ использовали спирты нормального строения: н-бутанол, н-пентанол, н-гексанол, н-октанол «Реахим». Полученную смесь тщательно встряхивали до получения оптически прозрачного раствора. В качестве органической среды использовали декан «Реахим». Размер водных ядер обращенных мицелл характеризуется молярным отношением вода/ПАВ (W_0), а содержание со-ПАВ молярным отношением со-ПАВ/ПАВ (σ). Для кинетических исследований ферментативных процессов использовали микроэмульсии при $W_0=12, 20$ и $C_{\text{ПАВ}}=0.1-0.3$ М.

Геминальные ПАВ растворяли в буферном растворе до необходимой концентрации. *Алкилоксибензолы* вносили в реакционную смесь в виде раствора в этаноле с таким расчетом, чтобы конечная концентрация спирта в реакционной смеси не превышала 0.05 объемных процентов.

2.3. Кинетические измерения

Кинетические измерения проводились на спектрофотометре *Lambda 25* (Perkin Elmer, США) с термостатируемым кюветным отделением. Для проведения кинетических экспериментов использовали кварцевые кюветы. К исследуемому раствору (буферный раствор или раствор амфифильных веществ) добавляли раствор белка и инкубировали при заданной температуре (25°C) в течение 10 минут. Реакцию инициировали введением субстрата. Субстрат вносили в виде раствора в буфере (ЭЭБА) и в диметилсульфоксиде (ДМСО) (БАПНА, БТНА). Концентрация трипсина и α -химотрипсина в реакционной смеси составляла соответственно 1.1 и 1.7 мкМ, концентрация субстратов – 1

мМ. В экспериментах по определению параметров уравнения Михаэлиса-Ментен концентрацию субстрата варьировали в диапазоне $(0.05-1.5)10^{-4}$ М. Исследования проводились в 50 мМ трис-НСl буфере. Активность ферментов контролировалась по реакциям гидролиза специфических субстратов ЭЭБА, БАПНА в случае трипсина и БТНА в случае α -химотрипсина. За скоростью гидролиза субстрата следили по изменению оптического поглощения при 253 нм (поглощение продукта гидролиза трипсина с ЭЭБА) и 390 нм (поглощение продукта гидролиза α -химотрипсина с БАПНА и БТНА – п-нитроанилина) (рис. 17).

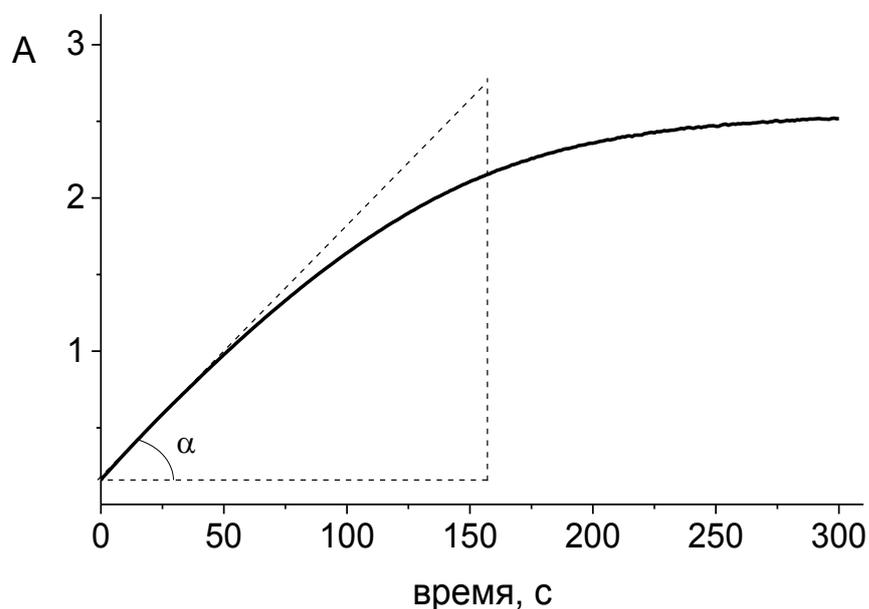


Рис. 17. Изменение оптической плотности исследуемого раствора во времени: кинетическая кривая в реакции гидролиза БАПНА.

Начальную скорость реакции (v_0) определяли по наклону линейной части кривой накопления продукта во времени в течение 1 мин после начала реакции и рассчитывали по уравнению 1:

$$v_0 = \Delta D / \Delta \epsilon l \Delta t \quad (1),$$

где $\Delta\varepsilon$ - молярной коэффициент поглощения продукта гидролиза, l – длина оптического пути.

Молярные коэффициенты поглощения продукта реакции определяли в независимом эксперименте. Для ЭЭБА $\Delta\varepsilon$ в буферном растворе был равен $1100 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$, в мицеллярных системах $1600 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ (АОТ, ЦТАБ). Для БТНА и БАПНА – $11000 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ в буферном растворе и $11500 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ в мицеллярных системах (АОТ, ЦТАБ).

Для анализа полученных значений использовали уравнение Михаэлиса-Ментен (уравнение 2) (Корниш-Боуден, 1979):

$$v_0 = \frac{V_m [S]_0}{K_M + [S]_0} \quad (2),$$

где V_m – максимальная скорость реакции, которая достигается при полном связывании фермента субстратом; $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата, K_M – константа Михаэлиса. При этом параметр V_m линейно увеличивается с ростом количества фермента, вводимого в реакцию:

$$V_m = k_{cat} [E]_0 \quad (3),$$

где E_0 – начальная концентрация фермента, k_{cat} – каталитическая константа реакции.

Величины максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса определяли из зависимостей начальных скоростей гидролиза от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка (уравнение 4, рис. 18) (Корниш-Боуден, 1979):

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_M}{V_m [S]_0} \quad (4).$$

Чаще используют не значение максимальной скорости, а вычисляют, так называемую, каталитическую константу (или число оборотов) – k_{cat} , которая в отличие от V_m не зависит от концентрации фермента:

$$k_{cat} = \frac{V_m}{[E]_0} \quad (5).$$

Эффективность катализа рассчитывается по формуле:

$$s = \frac{k_{cat}}{K_M} \quad (6).$$

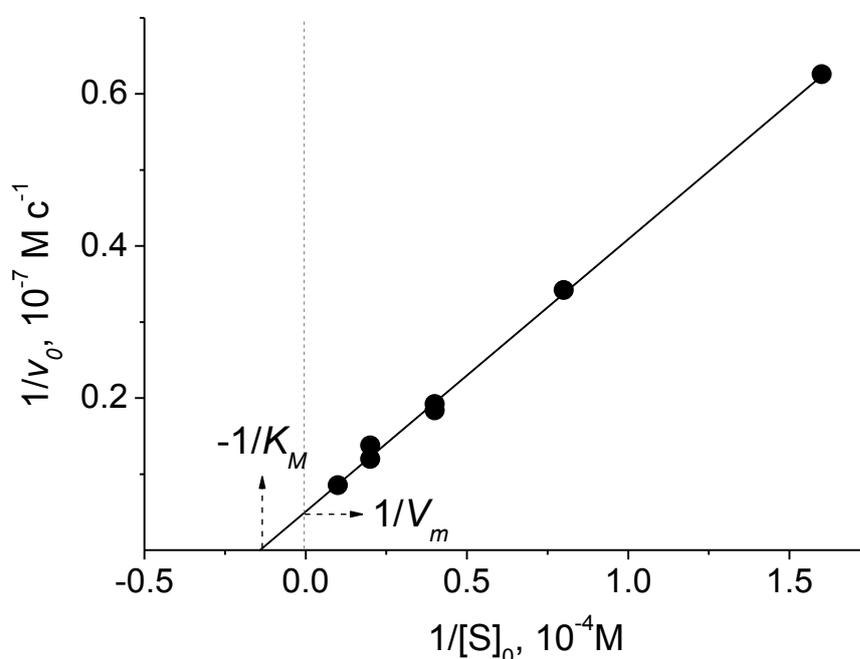


Рис. 18. Определение параметров уравнения Михаэлиса-Ментен методом Лайнуивера-Берка для реакции гидролиза БАПНА (25°C).

Константа Михаэлиса характеризует сродство фермента к субстрату, а максимальная скорость отвечает активности фермента в условиях его насыщения субстратом. Стоит отметить, что константа Михаэлиса является мерой истинной константы связывания K_S , только при $k_{-1} \gg k_2$.

Уравнение Михаэлиса-Ментен было предложено для реакций, протекающих в гомогенной среде. В случае ферментативных реакций,

протекающих в мицеллярных системах, где возможно распределение субстрата между псевдофазами, наблюдаемое изменение K_M может быть связано не с изменением истинных каталитических свойств фермента, а обусловлено эффектом перераспределения субстрата (Хмельницкий и др., 1989).

Значения рН в микроэмульсиях и в водных растворах трипсина и α -химотрипсина. Активность ферментов во многом определяется их конформацией. В случае трипсина и α -химотрипсина их конформация сильно зависит от свойств окружающей среды (температура, ионная сила, концентрация водородных ионов). Внутренняя полость обращенных мицелл характеризуется высокой концентрацией электрических зарядов, которые возникают при ионизации полярных групп молекул ПАВ. Вследствии этого значение рН водной полости мицелл может отличаться от рН исходного буферного раствора. Для определения зависимости активности сериновых протеаз от рН, были проведены соответствующие эксперименты в водных растворах и в микроэмульсионных средах (рис. 19, 20).

Значения рН в водной среде отличается от значения рН водной полости обращенной мицеллы. Максимальная ферментативная активность в водном растворе наблюдается при рН - 7.5, а в микроэмульсиях АОТ и ЦТАБ при рН – 8.5. Значения рН внутренней (водной) полости обращенных мицелл сдвигаются в более кислую область рН по сравнению с водным раствором. Полученные результаты согласуются с данными литературы (El-Seoud et al., 1983; Березин, 1985). Поэтому все дальнейшие эксперименты в микроэмульсиях проводили при оптимуме рН 8.5.

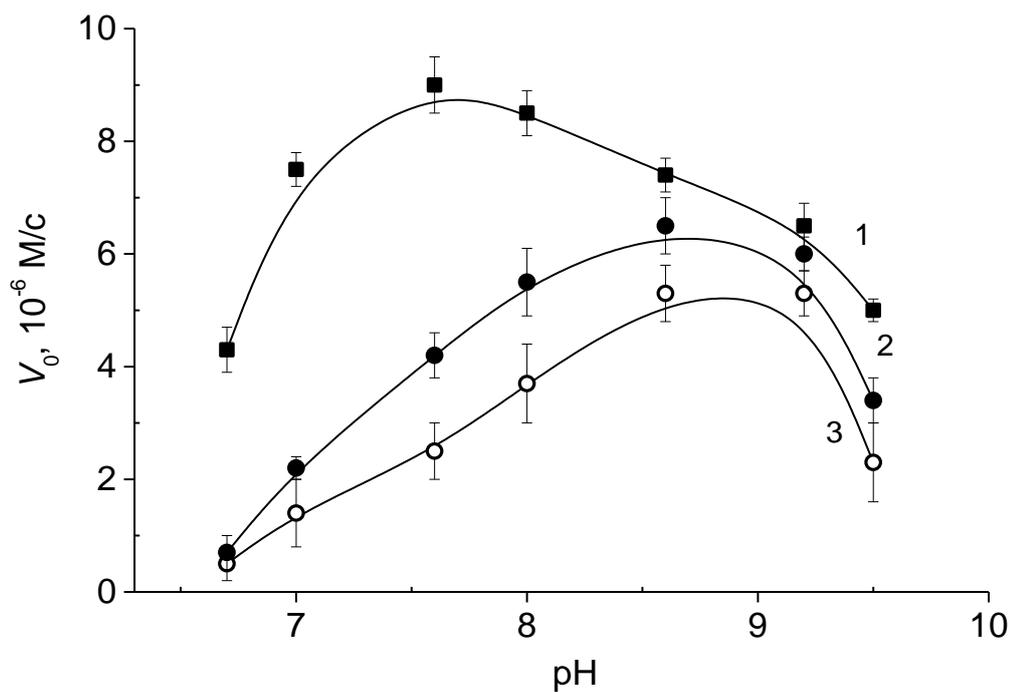


Рис. 19. Профиль pH активности трипсина в реакции гидролиза ЭЭБА: водный раствор (1), АОТ (0.1М, $W_0=20$) (2), ЦТАБ (0.1М, $W_0=20$) (3) ($T=25^\circ\text{C}$, $[E]_0=0.5 \text{ мкМ}$, $[S]_0=1 \text{ мМ}$).

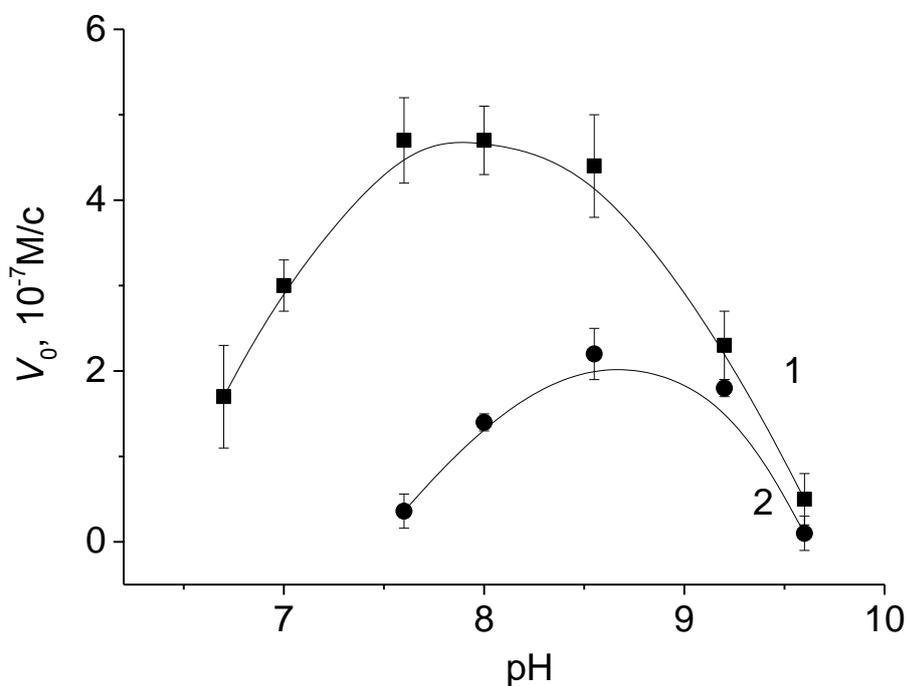


Рис. 20. Профиль pH активности α -химотрипсина в реакции гидролиза БТНА: водный раствор (1), ЦТАБ (0.1М, $W_0=20$) (2) ($T=25^\circ\text{C}$, $[E]_0=0.5 \text{ мкМ}$, $[S]_0=1 \text{ мМ}$).

2.4. ЯМР-самодиффузия

Измерения коэффициентов самодиффузии (КСД) компонентов микроэмульсий выполнены на спектрометре ЯМР *AVANCE III 600* фирмы Bruker с датчиком ТХ1 5 мм, оснащенный градиентной катушкой. Для измерения КСД использована импульсная последовательность «стимулированное эхо» (Strejskal, Tanner, 1965) с биполярными градиентами. Для минимизации нежелательных эффектов, связанных с токами Фуко, использовали синусоидальную форму градиентных импульсов. Измерения КСД ПАВ проведены на ядрах протонов ^1H (600.13 МГц). Градиент магнитного поля в экспериментах изменяли в интервале от 0 до 0.5 Тл/м при постоянном времени диффузии и длительности импульсов градиента магнитного поля. Время диффузии для каждого эксперимента варьировали в интервале от 50 до 100 мс, а длительность градиентного импульса – от 3 до 6.5 мс. Для подавления сигнала от протонов воды использовали импульсную последовательность 3-9-19 (Piotto et al., 1992). Длительность 90-градусного импульса на ядрах протонов была равна 9.5 мкс. Число накоплений сигналов в зависимости от отношения сигнал/шум составляло от 8 до 32 при задержке между измерениями 5 с. Количество точек на диффузионных спадах варьировали от 16 до 32. На подгоночных кривых диффузионных спадов среднеквадратичное отклонение не превышало $(3-5)\times 10^{-3}$.

2.5. Флуоресцентная спектроскопия

Регистрация флуоресценции триптофановых остатков, входящих в состав трипсина и α -химотрипсина, была выполнена на спектрофлуориметре *Флюорат-02-Панорама* (ЛЮМЕКС, Россия) в диапазоне длин волн 310–400 нм при длине волны возбуждения 295 нм. Во всех экспериментах учитывали фоновый спектр буфера без добавления белка. Образцы перед измерением

термостатировали в кварцевых кюветах при заданной температуре в течении 10 минут. Концентрация белка в исследуемых образцах составляла 20 мкМ. Концентрацию ПАВ варьировали в интервале 0.03 – 1.0 мМ.

2.6. ИК-спектроскопия

Метод ИК-спектроскопии применялся для контроля структурных изменений в молекулах трипсина и α -химотрипсина под действием амфифильных соединений. Для снятия ИК-спектров проводили обмен доступных протонов в трипсине и α -химотрипсине и лигандах на дейтероны. Для этого белки и лиганды растворяли в 50 мМ трис DCI буфере, приготовленном на D₂O, рD 7.6. После 3-часовой инкубации растворов при комнатной температуре их лиофилизировали. После этого белки, лиганды и смеси растворяли в дейтерированной воде, доводя растворы до требуемой концентрации: 0.1 мМ для белка и 4 мМ для лиганда. Весовая концентрация белка в растворах составляла 2.5 мг/мл. Спектры ИК регистрировали на спектрофотометре *Tensor 27* (Bruker, Германия), спектральное разрешение 4 см⁻¹, 128 сканов. Исследуемые растворы помещали в термостатируемую кювету из CaF₂ с толщиной слоя 100 или 10 мкм. Из спектров растворов вычитали спектры растворителя, снятые при тех же температурах, и спектры паров атмосферной воды. Сглаживания спектров не производили. Отнесение компонент в спектре нативного белка выполнено на основе литературных данных (Barth, 2000).

2.7. Динамическое светорассеяние

Эксперименты по динамическому светорассеянию исследуемых систем проводили на приборе *Zetasizer Nano ZS* (Malvern Instruments, Великобритания).

Растворы перед измерением отфильтровывали, а затем термостатировали при заданной температуре (25°C) в течение 10 минут. Анализ данных проводили с использованием встроенного программного обеспечения (Malvern DTS software, версия 5.0).

Концентрация ПАВ составляла 1 мМ, концентрация белка – 0.2 мг/мл. Каждое полученное значение среднего гидродинамического диаметра частиц являлось средним из 10 измерений. Средняя ошибка экспериментальных данных, полученных этим методом, не превышала 4 %.

2.8. Молекулярный докинг

Анализ вероятности образования комплексов белок-лиганд выполнен методом молекулярного докинга с использованием компьютерной программы «Autodock 4.2» (Morris et al., 2009). Расчет полной энергии взаимодействия осуществлялся с учетом электростатических (ΔG_{elec}), Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий (ΔG_{vdw}), водородных связей (ΔG_{hbond}), эффекта сольватации (ΔG_{sol}) и торсионной энтропии (ΔG_{tor}) (уравнение 7):

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol}. \quad (7).$$

Программа “Autodock” использовала специальный алгоритм (Lamarckian genetic algorithm) для поиска конфигурации комплекса белок-лиганд с минимальной свободной энергией. Белок рассматривался как жесткая структура, в то время как в лиганде было разрешено вращение вокруг одинарных связей. Структура и распределение зарядов лигандов были предварительно оптимизированы с помощью метода РМЗ, общий заряд лиганда задавался равным нулю. Структура белков была взята из Protein Data Bank (Bernstein et al., 1977), распределение зарядов в белке соответствовало значению рН 7. Считалось, что аминокислотный остаток белка образует

комплекс с молекулой ГПАВ, если расстояние между ним и любым атомом лиганда меньше 4 Å.

2.9. Исследование солюбилизационной емкости растворов ПАВ

Исследование солюбилизационной емкости растворов геминальных ПАВ проводили по известной методике (Аблакова и др., 2010). В качестве зонда использовали БТНА и БАПНА. Солюбилизационную емкость растворов ГПАВ определяли как отношение растворимости субстратов в исследуемом растворе ГПАВ к их растворимости в воде. Для этого растворы ГПАВ с избыточным содержанием БТНА и БАПНА выдерживали при 25°C в течение 5 ч при постоянном перемешивании. По истечении указанного времени растворы отфильтровывали для удаления нерастворившегося зонда. Концентрацию БТНА и БАПНА определяли по их поглощению на длине волны 323 нм.

2.10. Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных проводили с применением стандартных математических методов (расчет среднеквадратического отклонения, сравнение средних по критерию Стьюдента) средствами программы OriginPro 8.5. Критерий вероятности $P < 0,05$ принимали достаточным для достоверной разницы опытной и контрольной групп данных.

ГЛАВА 3. СТРУКТУРА И АКТИВНОСТЬ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ В МИКРОЭМУЛЬСИОННЫХ СРЕДАХ

3.1. Влияние алифатических спиртов на каталитическую активность трипсина в среде обращенных мицелл

В связи с тем, что растворы обращенных мицелл и микроэмульсий представляют собой водные нанокapли, стабилизированные монослоем ПАВ в жидкой углеводородной среде, они широко используются в качестве нанореакторов для проведения ферментативных реакций (Klyachko, Levashov, 2003). В этом случае структура мицеллярных агрегатов является одним из факторов, позволяющих регулировать их каталитические свойства. Зачастую для приготовления мицеллярных систем на основе ПАВ требуется дополнительная компонента - со-ПАВ, в качестве которой, например, используют алифатические спирты нормального строения. Исследование влияния структуры микроэмульсионной среды на каталитическую активность трипсина и α -химотрипсина, иммобилизованных в водных ядрах обращенных мицелл (АОТ и ЦТАБ), проводили с использованием в качестве со-ПАВ ряда спиртов нормального строения: бутанол, пентанол, гексанол, октанол. Алифатические спирты были выбраны не случайно, поскольку они образуют широкий ряд со-ПАВ с мягко изменяющимися гидрофобными свойствами.

Для контрольного сравнения были проведены эксперименты по влиянию спиртов на каталитическую активность трипсина в водном (буферном) растворе. В присутствии 1% спиртов, в буферном растворе, наблюдалось некоторое увеличение скорости реакции (с бутанолом и пентанолом) или небольшое замедление (гексанол) относительно контроля (рис. 21). В литературе известна (Flores et al., 1982, Нарижнева, Уверский, 1998) колоколообразная зависимость активности ферментов в водных растворах от длины алифатической цепи спиртов, связанная с трансформацией структуры

его активного центра. В отличие от водного раствора в микроэмульсионной среде каталитическая активность трипсина уменьшается в присутствии нормальных алифатических спиртов (рис. 21).

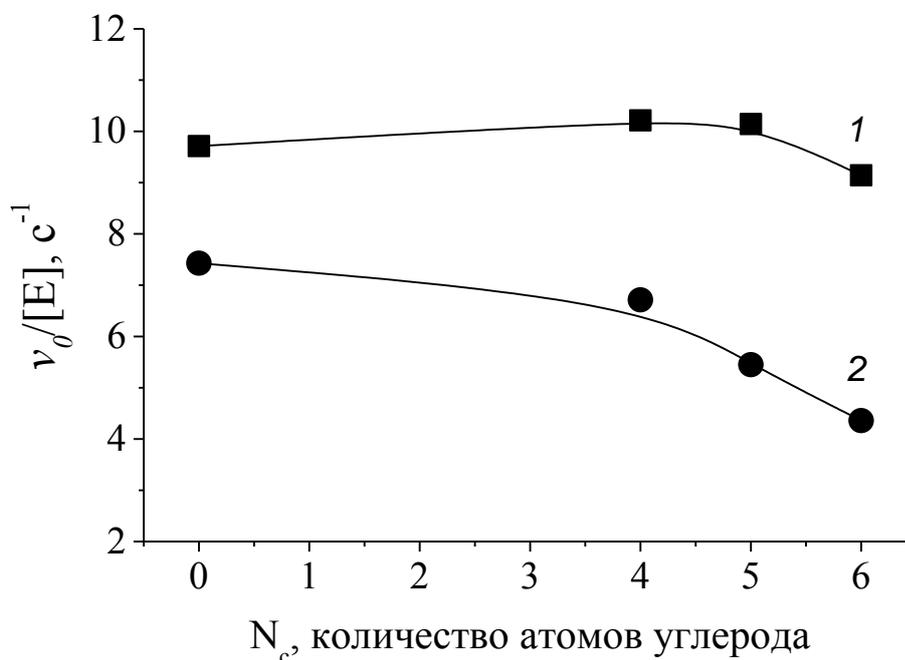


Рис. 21. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза ЭЭБА от длины алифатической цепи спиртов (1%) в буферном растворе (1) и в мицеллярной системе АОТ (2).

Влияние спиртов на структуру микроэмульсий исследовали методами ЯМР и ИК спектроскопии. Диффузия молекул АОТ, сосредоточенных в мицеллярных агрегатах, позволяет определить размер мицелл (Fedotov et al., 1996). Гидродинамический радиус мицелл (R) определяется с помощью коэффициентов самодиффузии (D) по уравнению Стокса-Эйнштейна для сферических частиц:

$$D = kT/6\pi\eta R \quad (8),$$

где k – константа Больцмана, T – абсолютная температура, η – вязкость растворителя. В микроэмульсиях $D_{ПАВ} \approx D_{МИЦ}$. На рисунке 22 представлены зависимости коэффициентов самодиффузии (КСД) для исследованной микроэмульсионной системы АОТ.

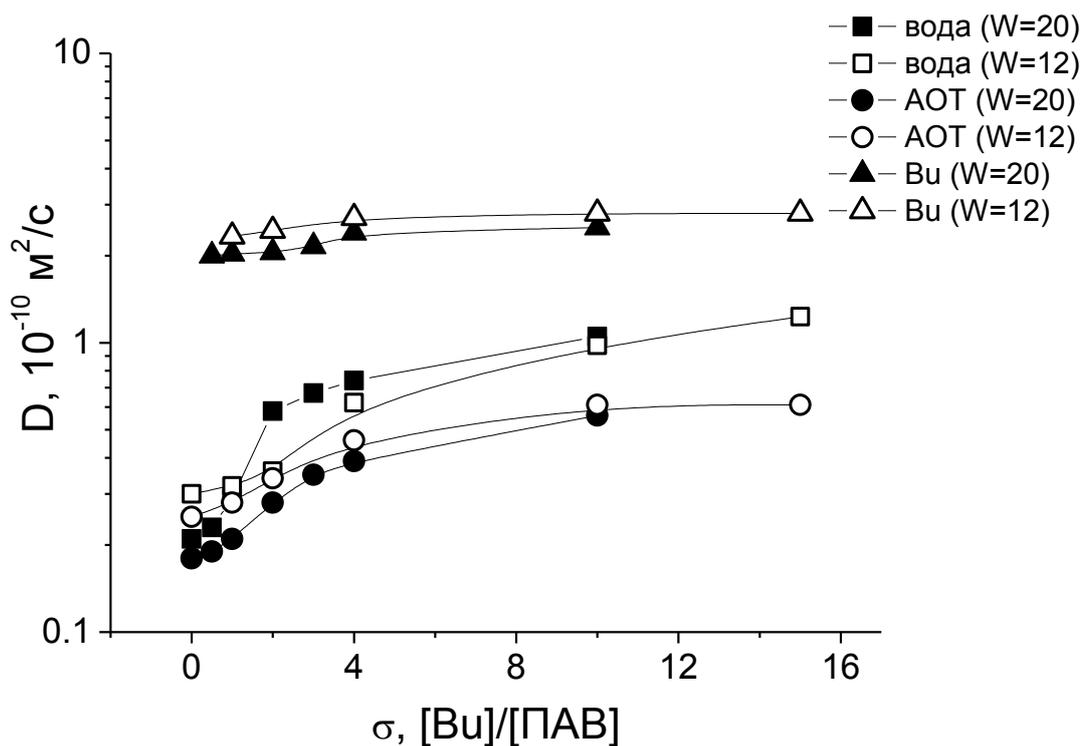


Рис. 22. Зависимость КСД компонент микроэмульсии от содержания н-бутанола в системе.

Полученные КСД компонент микроэмульсии позволили определить, что в отсутствии спирта средний гидродинамический радиус обращенной мицеллы составляет 3.8 нм. При введении спирта в систему основная его часть локализуется на поверхности мицелл, выполняя функции со-ПАВ. При этом меняется соотношение «объем водного ядра»/«площадь его поверхности» и радиус мицелл уменьшается. Происходит резкое уменьшение гидродинамического радиуса в диапазоне σ от 0 до 4. Диффузионные данные для системы с н-бутанолом показывают уменьшение радиуса мицелл до 3.3 нм (рис. 22).

Данные ИК-спектроскопии (рис. 23) показывают, что добавление спиртов вызывает высокочастотный сдвиг полосы δOH (1643 см^{-1}), свидетельствующий о росте доли более сильно связанных молекул воды. Величина сдвига близка для всех использованных спиртов, однако имеется тенденция к увеличению прочности водородных связей с ростом длины алифатической цепи спиртов.

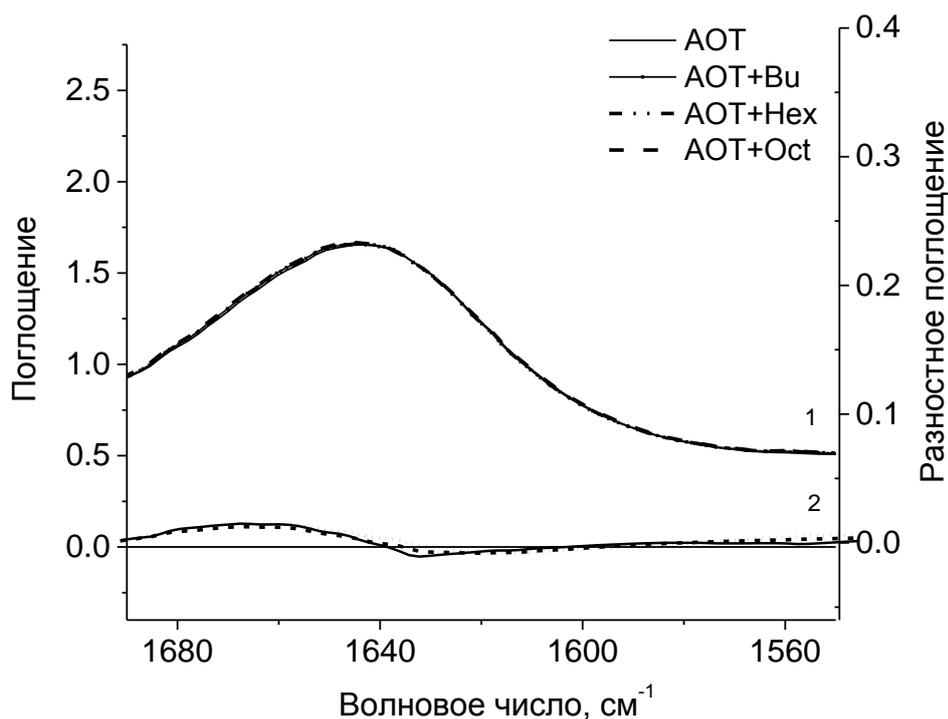


Рис. 23. Инфракрасные спектры трипсина: высокочастотный сдвиг полосы ОН (1) и разностные спектры (2).

ИК-спектры также свидетельствуют (рис. 24) о нарушении вторичной структуры трипсина, иммобилизованного в водных ядрах обращенных мицелл. Существенные изменения в области поглощения β -структуры белка (1633 см^{-1}) по сравнению с буферным раствором наблюдаются уже в базовой (без спирта) мицеллярной системе АОТ/декан/вода. На фоне влияния самой микроэмульсии на вторичную структуру белка присутствие спирта вносит дополнительный вклад в эти изменения и относительное количество β -структуры в белке продолжает снижаться по мере увеличения гидрофобности спирта (рис. 25).

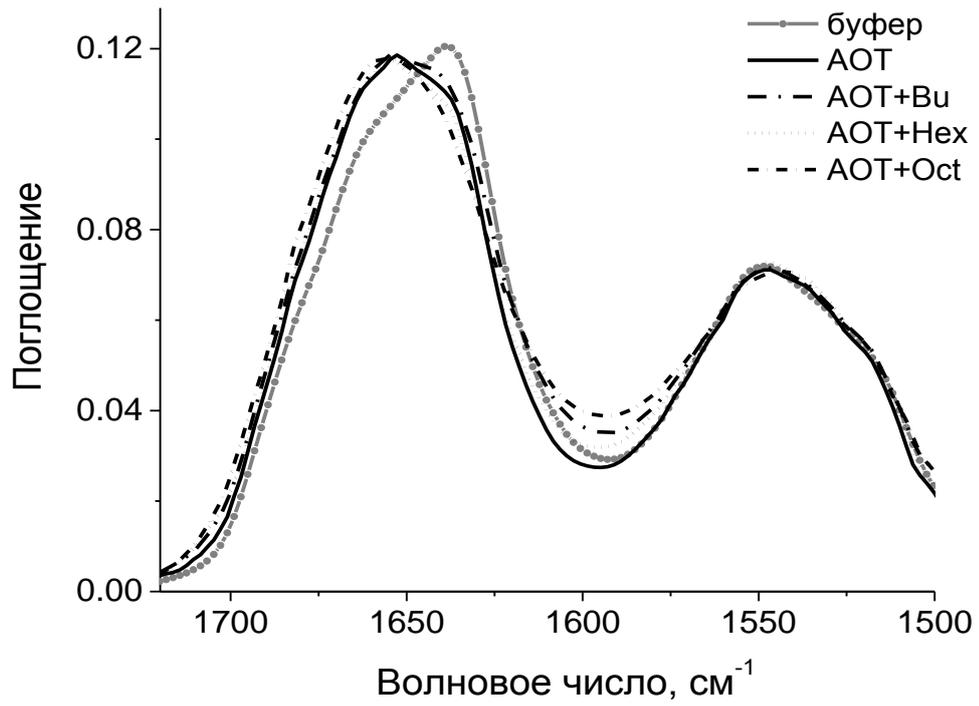


Рис. 24. Инфракрасные спектры трипсина в присутствии спиртов в буферном растворе и в микроэмульсии АОТ.

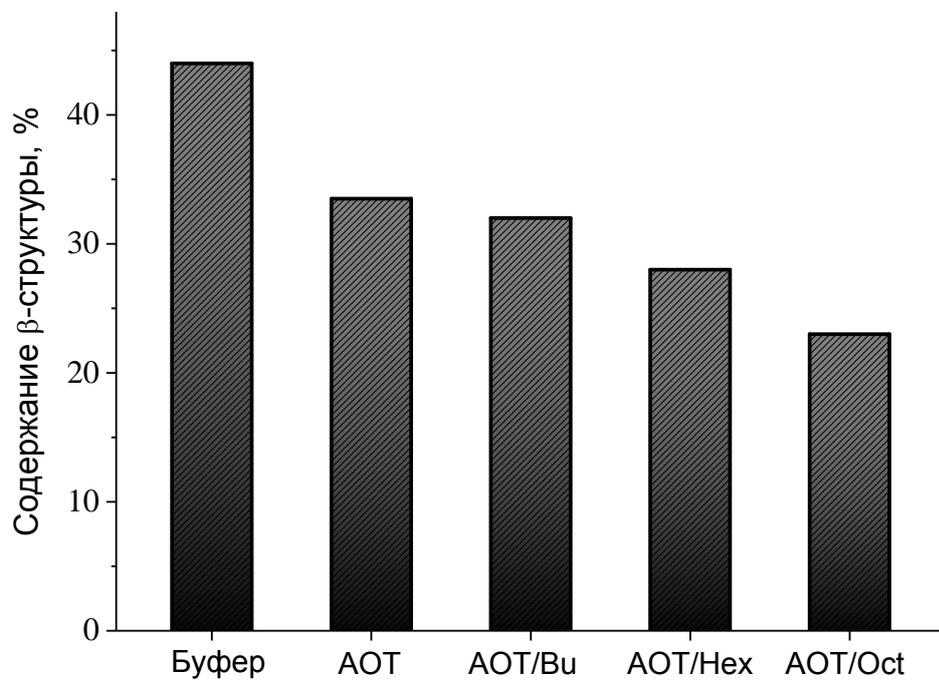


Рис. 25. Относительные изменения доли β-структуры в молекуле трипсина в присутствии спиртов.

Следует отметить, что уже в базовой мицеллярной системе фермент приобретает более спираллизованную форму (1658 см^{-1}) по сравнению с буферным раствором (рис. 24). Изменения в структуре микроэмульсий привели и к модификации каталитической активности трипсина.

Проведенные исследования показали, что в отличие от водного буферного раствора в микроэмульсионной реакционной среде каталитическая активность трипсина уменьшается в присутствии нормальных алифатических спиртов. Наиболее вероятной причиной этих отличий является как уменьшение размеров мицеллярных агрегатов и, следовательно, усиление влияния зарядов поверхности раздела фаз (головных групп ПАВ), так и модификация структуры фермента под действием изменяющихся свойств водной среды (усиление водородных связей).

Учитывая полученные данные об изменениях во вторичной структуре фермента под действием спиртов (рис. 25), было уделено внимание модифицирующему влиянию спиртов на микроэмульсионную реакционную среду, связанному с изменением полярности ее органической фазы. Для дальнейших экспериментов в качестве со-ПАВ из представленных спиртов был выбран н-бутанол.

В первую очередь была исследована активность трипсина в микроэмульсиях АОТ в присутствии н-бутанола. Анализ зависимостей начальной скорости реакции гидролиза ЭЭБА от концентрации спирта, показал, что в присутствии со-ПАВ наблюдается уменьшение активности белка с повышением концентрации н-бутанола в системе АОТ (рис. 26).

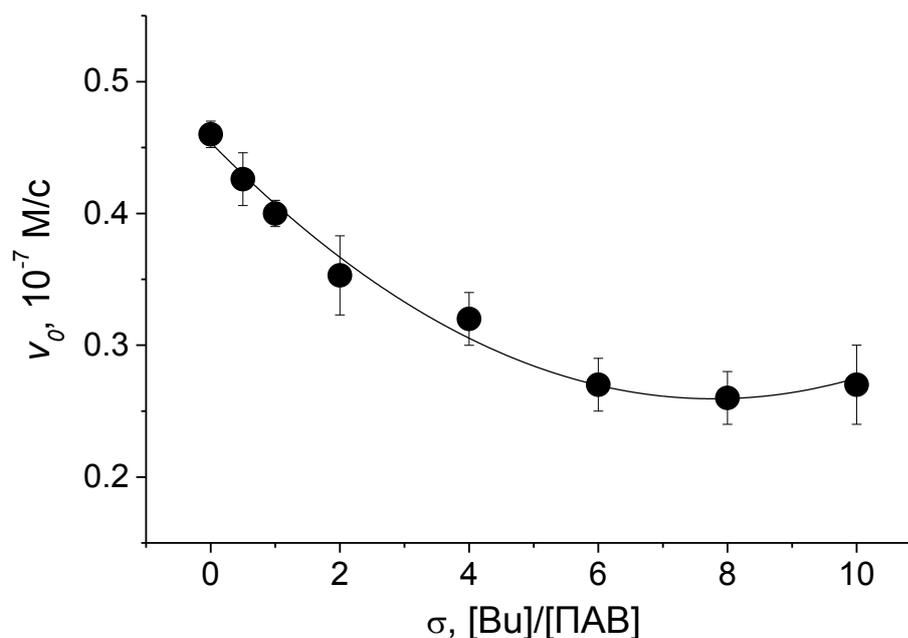


Рис. 26. Зависимость начальной скорости гидролиза ЭЭБА от концентрации н-бутанола в микроэмульсионной системе АОТ.

Для выявления причин подобной зависимости была изучена структура микроэмульсии методом ЯМР с Фурье-преобразованием и импульсным градиентом магнитного поля. Измеренные диффузионные параметры позволили провести структурный анализ микроэмульсий и определить изменение размеров мицеллярных агрегатов и распределение воды и спирта между мицеллами и органической дисперсионной средой (деканом). Установлено, что спирты сложным образом распределяются между водным ядром обращенных мицелл, их углеводородной оболочкой и объемной органической фазой. Присутствие спирта вызывает уменьшение размера мицелл и увеличение полярности дисперсионной среды. Полярность дисперсионной среды увеличивается, поскольку солюбилизующая емкость мицелл по отношению к спирту ограничена и при увеличении спирта в системе возрастает его количество в среде декана, а вместе со спиртом туда проникает и вода (Рис. 27).

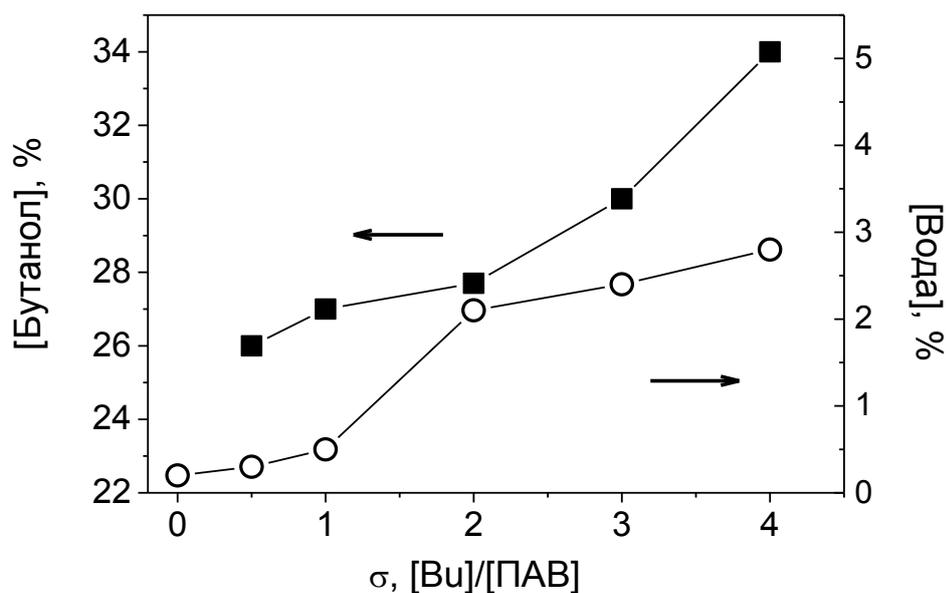


Рис. 27. Относительные доли воды и н-бутанола в дисперсионной среде АОТ.

Увеличение полярности органической дисперсионной фазы микроэмульсии изменяет распределение субстрата между фазами системы. При этом меняется концентрация субстрата в зоне реакции (водное ядро обращенных мицелл), что отражается на абсолютных значениях скорости гидролитического процесса.

Для проверки этой гипотезы были выполнены эксперименты по растворимости одного из субстратов, ЭЭБА, в органической фазе, состав которой определялся на основе данных ЯМР по коэффициентам самодиффузии АОТ, декана, н-бутанола и воды в рамках модели двух состояний, когда две последние компоненты системы могут находиться как в составе мицелл так и в дисперсионной среде.

Данные, приведенные на рисунке 28, наглядно демонстрируют увеличение растворимости ЭЭБА в органической среде при росте количества н-бутанола в ней. Полученные данные по растворимости ЭЭБА в дисперсионной среде микроэмульсии позволили определить его концентрацию в водных ядрах обращенных мицелл.

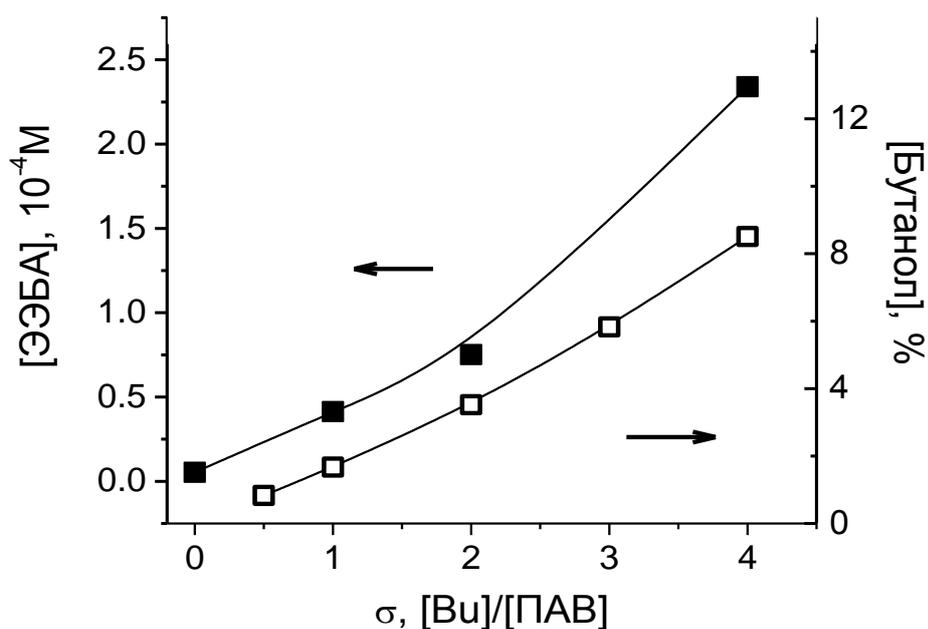


Рис. 28. Изменение концентрации субстрата и н-бутанола в дисперсионной среде АОТ.

Таким образом, ингибирование реакции гидролиза ЭЭБА трипсином в микроэмульсионной системе АОТ существенно усиливается при увеличении длины алифатического радикала спирта (Рис. 21). В этом случае решающим становится сочетание двух факторов. С одной стороны, происходит увеличение растворимости спиртов в водных ядрах мицелл по сравнению с объемной водой и повышение их концентрации в зоне реакции. С другой стороны, известно о повышении денатурирующего действия спирта на трипсин при увеличении длины его углеводородного радикала (рис. 25).

В то же время рост содержания н-бутанола в системе приводит к увеличению полярности дисперсионной среды микроэмульсии и перераспределению субстрата между фазами системы. В свою очередь это приводит к изменению доступности субстрата и падению каталитической активности фермента.

3.2. Влияние заряда межфазной поверхности на структуру и активность трипсина и α -химотрипсина в обращенных мицеллах

Влияние алифатических спиртов на реакции, катализируемые сериновыми протеазами, имеет сложный характер (Lu et al., 2002, Simon et al., 2001). Это обусловлено в частности с тем, что спирты выступают в качестве нуклеофилов, конкурирующих с действием молекул воды на стадии деацилирования промежуточного ацилфермента (Мартинек и др., 1970). С молекулами трипсина фермент-субстратный комплекс формируется в основном за счет сил электростатического взаимодействия, которое в микрогетерогенной среде определяется не только зарядами участников реакции, но и диэлектрической проницаемостью полярной фазы и поверхностным потенциалом межфазной поверхности. В случае α -химотрипсина определяющими становятся гидрофобные взаимодействия. Используя различные ПАВ, можно варьировать знак и величину поверхностного заряда, то есть условия функционирования фермента в водном ядре обращенной мицеллы, что отражается на скорости ферментативного процесса (Левашов и др., 1980, Fandavis et al., 1998). Представляя всю сложность действия алифатического спирта на систему обращенных мицелл с солюбилизированным в ней ферментом, мы, тем не менее, опираясь на известные факты, использовали *n*-бутанол для модификации поверхности раздела фаз в дисперсиях обращенных мицелл на основе анионного АОТ и катионного ЦТАБ.

Установлено, что присутствие спирта вносит заметные изменения в каталитическую активность ферментов (Раздел 3.1.). Анализ зависимостей начальной скорости реакции гидролиза ЭЭБА, БАПНА и БТНА, позволил проследить, как изменяются кинетические параметры в исследуемых микроэмульсиях. В контрольном буферном растворе при повышении концентрации *n*-бутанола происходит увеличение начальной скорости реакции гидролиза ЭЭБА, БАПНА и БТНА, а затем наблюдается резкий спад активности фермента (рис. 29, 30, 31). Это согласуется с литературными

данными (Белова и др., 1991), которые показывают, что действие полярного органического растворителя имеет обычно пороговый характер, связанный с денатурацией белковой глобулы при достижении «критической» концентрации органического растворителя.

В системах обращенных мицелл АОТ профиль зависимости активности ферментов от содержания н-бутанола принципиально отличается от мицелл ЦТАБ (рис. 29, 31).

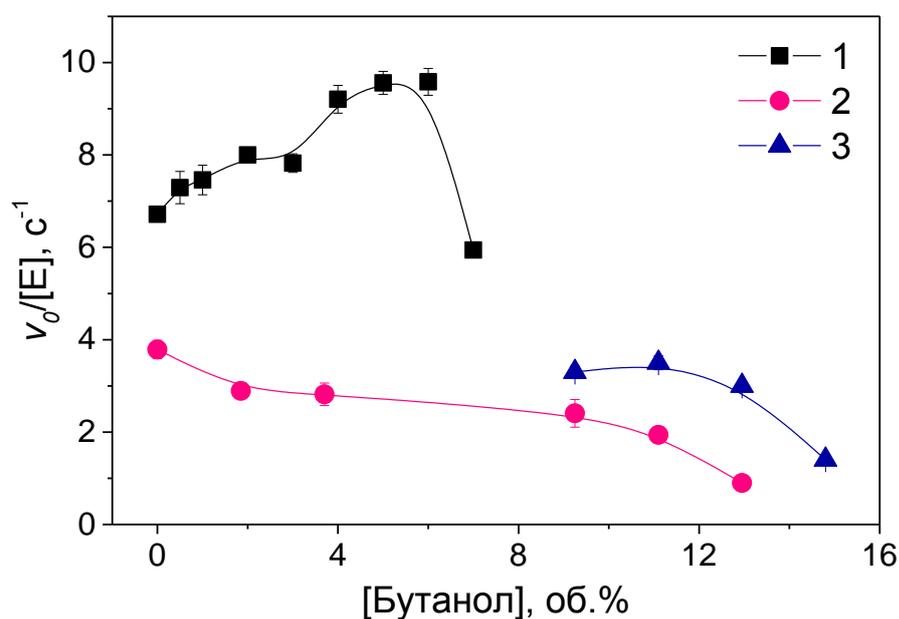


Рис. 29. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза ЭЭБА, катализируемого трипсином, от концентрации н-бутанола в контрольном (буферном) растворе (1), в системе АОТ (2) и ЦТАБ (2).

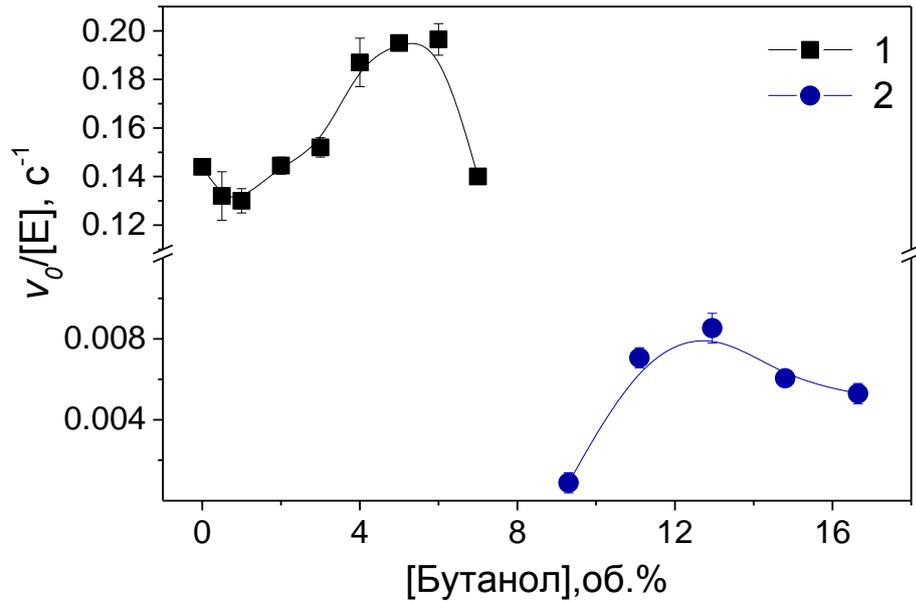


Рис. 30. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза БАПНА, катализируемого трипсином, от концентрации н-бутанола в контрольном (буферном) растворе (1) и системе ЦТАБ (2).

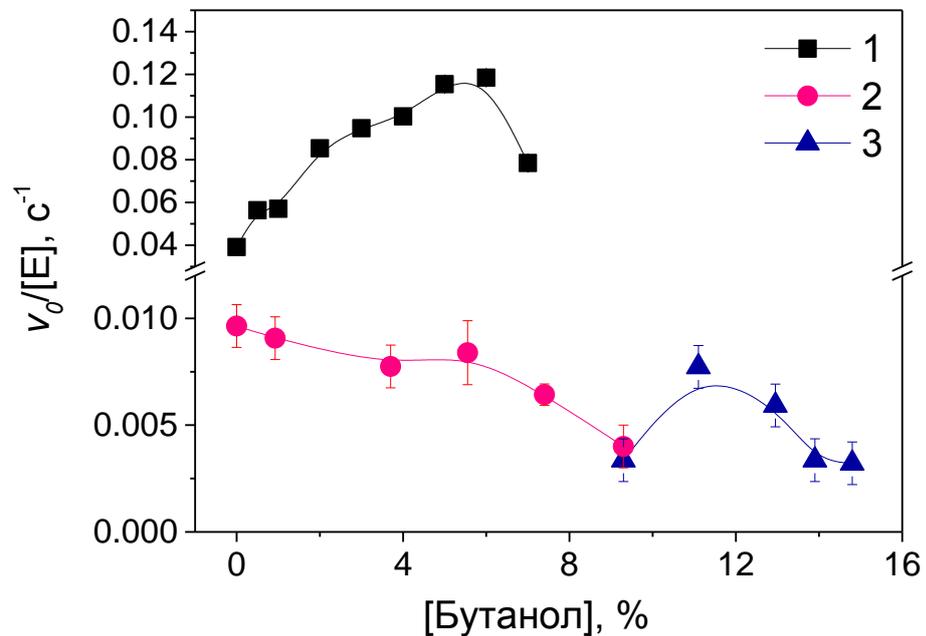


Рис. 31. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза БТНА, катализируемого α -химотрипсином, от концентрации н-бутанола в контрольном (буферном) растворе (1), в системе АОТ (2) и ЦТАБ (2).

Прежде, чем обсуждать влияние системы обращенных мицелл на каталитическую активность ферментов, следует отметить следующие обстоятельства. Несмотря на то, что предельная растворимость н-бутанола в 100 г воды составляет 7.81 г при 20°C (Гороновский и др., 1987), уровень его солюбилизации в системах обращенных мицелл существенно превышает это значение, поскольку алифатический спирт может сложным образом распределяться между водным ядром обращенных мицелл, их углеводородной оболочкой и дисперсионной органической средой. Кроме того, если для анионного АОТ возможна вариация количества спирта от нуля и выше, системы на основе катионного ЦТАБ формируют дисперсии обращенных мицелл (изотропные микроэмульсии вода/масло) только при содержании н-бутанола выше, приблизительно 9 об.%, и уменьшить это значение при использовании буфера в качестве водной фазы не удастся.

Для систем на основе АОТ при повышении концентрации н-бутанола от 0 до 13 об.% наблюдается немонотонное снижение начальной скорости гидролиза ЭЭБА и БТНА (рис. 29, 31). Абсолютные значения скорости реакции несколько ниже в обращенных мицеллах АОТ, что может быть как следствием уменьшения концентрации катионного субстрата в зоне реакции за счет его электростатического «заякоривания» на межфазной поверхности раздела, сформированной анионным АОТ (Stupishina et al., 2001), так и следствием перераспределения субстрата между фазами системы в присутствии спирта. В случае гидролиза нитроанилидного субстрата БАПНА в АОТ реакция не фиксируется, как в отсутствие, так и в присутствии н-бутанола.

Кинетическая картина существенно меняется для гидролиза специфических субстратов в катионном ПАВ - ЦТАБ. С увеличением концентрации н-бутанола начальная скорость реакции увеличивается до порогового значения, а затем наблюдается ее уменьшение (рис. 29, 30, 31).

Одной из причин сложной зависимости активности ферментов от концентрации спирта в мицеллярных системах может быть нестабильность его третичной структуры. Для выяснения механизмов действия н-бутанола на

каталитическую активность ферментов были исследованы спектры внутренней (триптофановой) флуоресценции трипсина. Как известно, количество триптофановых остатков в α -химотрипсине превышает их количество для трипсина в два раза, однако их распределение в молекуле аналогично. Известно, что максимум флуоресценции триптофана (λ_{\max} Trp) зависит от полярности его микроокружения (Lakowicz, 1999), если окружение триптофана становится более гидрофобным, наблюдается коротковолновое смещение λ_{\max} , так называемый «голубой» сдвиг. Как следует из данных, приведенных на рисунке 32, значение максимума триптофановой флуоресценции трипсина сдвигается в область больших длин волн при увеличении количества н-бутанола, что свидетельствует о прогрессивных денатурационных изменениях белковой молекулы (Zuev et al., 2004).

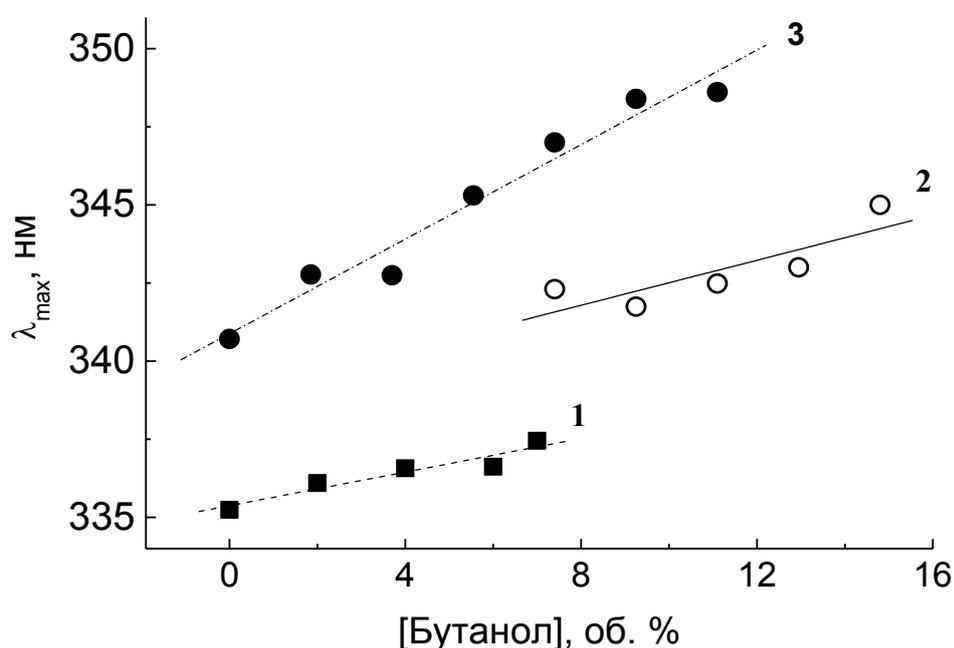


Рис. 32. Зависимость максимума триптофановой флуоресценции для трипсина от концентрации н-бутанола в буферном растворе (1) и в ЦТАБ (2) и АОТ (3).

Следует обратить внимание, что при содержании н-бутанола 7-15 об.% степень денатурации трипсина в системе на основе ЦТАБ существенно меньше, чем для АОТ. Возможно, именно этим объясняются более высокие значения скорости гидролиза ЭЭБА в мицеллах ЦТАБ по сравнению с АОТ при высоком содержании спирта (рис. 29). Полученные данные показывают, что трипсин сохраняет высокую активность по сравнению с буферным раствором даже при значительных структурных изменениях.

На основании полученных данных по самодиффузии компонентов изученных систем была определена доля н-бутанола, входящего в состав самих обращенных мицелл (рис. 33).

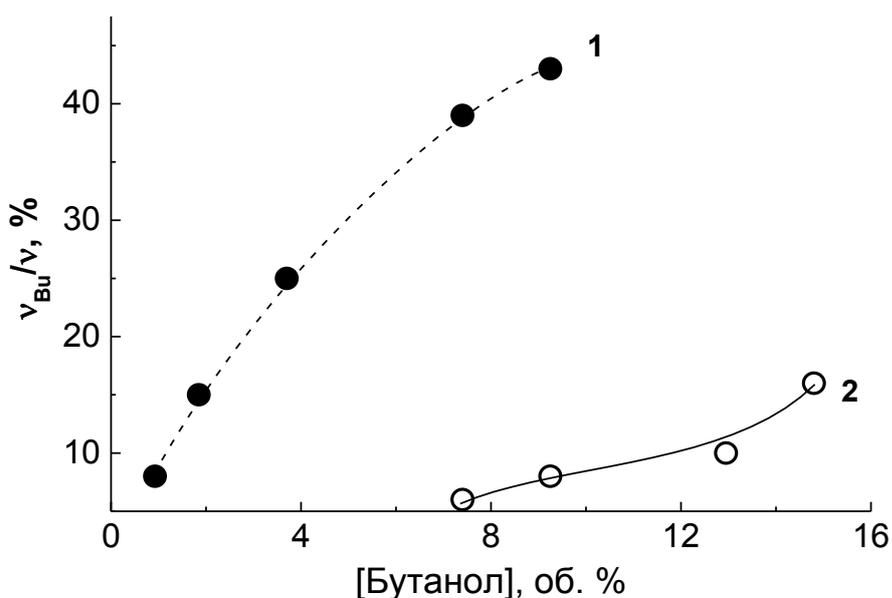


Рис. 33. Зависимость относительной доли н-бутанола, солюбилизированного обращенными мицеллами, от общего содержания н-бутанола в системе обращенных мицелл: АОТ (1) и ЦТАБ (2).

Оказалось, что для обращенных мицелл образованных ЦТАБ количество н-бутанола, входящего в состав мицелл, не превышает 15 % от его общего содержания в системе, в то время как обращенные мицеллы АОТ имеют значительно более высокую солюбилизационную емкость по отношению к

этому спирту. Следовательно, н-бутанол может сложным образом распределяться между водным ядром обращенных мицелл, их углеводородной оболочкой и объемной органической фазой. При этом, очевидно, происходит модификация структуры микроэмульсии, вызывая изменения каталитических свойств фермента.

Таким образом, уровень каталитической активности ферментов в системе обращенных мицелл определяется степенью модификации системы вносимой добавкой (н-бутанол). Исследованные системы различным образом реагируют на вносимую модифицирующую добавку.

Для катионного ЦТАБ в большом интервале концентраций вводимого н-бутанола количество спирта в составе дисперсной фазы (обращенные мицеллярные агрегаты) остается практически на одном уровне, а в микроэмульсии на основе анионного АОТ прогрессивно увеличивается, намного превышая предельную растворимость н-бутанола в чистой воде (рис. 33). Различное количество солюбилизированного н-бутанола в исследованных системах приводит к различным уровням разворачивания белковой макромолекулы (рис. 32).

При действии н-бутанола можно было наблюдать достаточно удовлетворительную корреляцию между изменениями состояния обращенных мицелл и структурой солюбилизированного фермента, что и определяет уровень его каталитической активности (рис. 29-31).

Вместе с тем, при использовании микрогетерогенных систем в качестве среды для неводного катализа необходимо учитывать распределение компонент этих систем между различными фазами (Раздел 3.1).

Таким образом, обобщая данные представленные в 3 главе, можно сделать вывод, что в обращенных мицеллах, содержащих фермент, внесение спирта в качестве со-ПАВ приводит к увеличению его содержания в водных ядрах мицелл, что оказывает влияние на структуру фермента. Размер мицелл

уменьшается. При дальнейшем увеличении концентрации спирта, возрастает его количество в дисперсионной среде, со спиртом туда проникает и вода. Это приводит к перераспределению субстрата между фазами системы и уменьшению его доступности для фермента, что и определяет его активность (рис. 34).

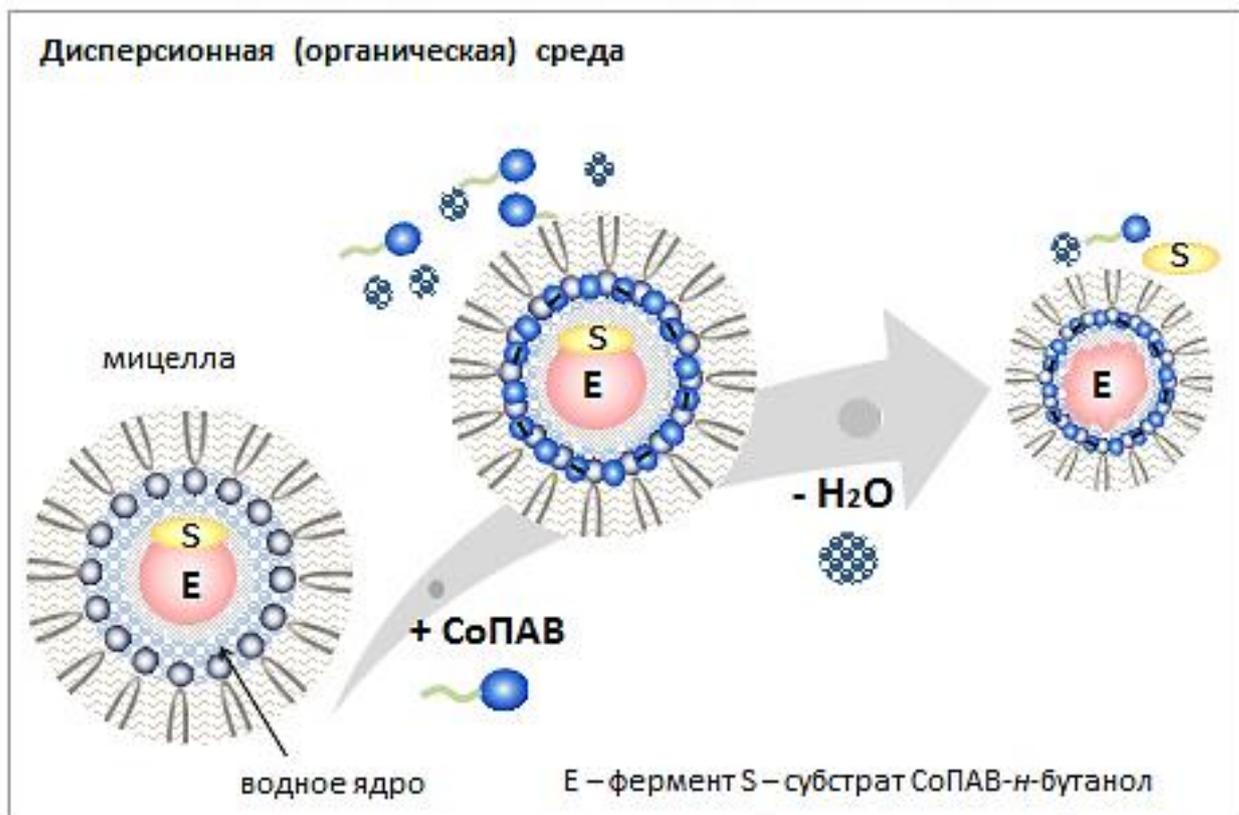


Рис. 34. Модель регуляторного действия микроэмульсионной среды на активность сериновых протеаз.

Полученные результаты показывают перспективность использования таких модифицирующих добавок, как нормальные спирты, для регуляции каталитической активности инкапсулированного фермента и для поиска молекулярных механизмов управления его активностью.

ГЛАВА 4. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ГЕМИНАЛЬНЫХ ПАВ

Агрегатное состояние ПАВ является определяющим для их участия в различных физико-химических и биологических процессах. В свою очередь от молекулярного строения ПАВ во многом зависит структура образованных мицеллярных агрегатов (Миргородская и др., 2010). В отличие от традиционных мономерных ПАВ, например ЦТАБ, молекулы геминальных (димерных) аналогов содержат две гидрофобные цепи и две полярные головные группы, ковалентно соединенные углеводородным спейсерным фрагментом различной длины и строения (Aswal et al.; 1999 Menger, 2000). По строению исследуемые в данной работе геминальные ПАВ можно разделить на две группы: 1 – геминальные ПАВ с гексаметиленовым спейсерным фрагментом, различающиеся длиной алкильных радикалов; 2 – гидроксилсодержащие геминальные ПАВ, различающиеся длиной полиметиленового спейсера. Известно (Вылегжанина и др., 2010), что для используемых геминальных ПАВ, имеющих шесть метиленовых звеньев в спейсерном фрагменте, в водных растворах характерно образование прямых мицелл.

4.1. Свойства растворов геминальных ПАВ как среды для ферментативных реакций

Важным, практически значимым свойством является способность ПАВ увеличивать растворимость различных органических соединений в воде и влиять при этом на физико-химические свойства и реакционную способность солюбилизированных веществ (Миттел, 1980). Субстраты, используемые в данной работе для определения активности трипсина и α -химотрипсина, БТНА и БАПНА – гидрофобные соединения, трудно растворимые в воде. Как правило, гидрофобные соединения хорошо связываются с мицеллами. При

концентрациях ПАВ ниже ККМ, также происходит связывание, но уже не с мицеллами, а со «свободными» молекулами ПАВ. В связи с этим представлялось целесообразным предварительно оценить солюбилизационные характеристики исследуемых геминальных ПАВ.

Солюбилизацию вещества растворами ПАВ оценивают при помощи коэффициента распределения вещества между мицеллой и водой (P) (Rosen, 1989; Rangel-Yagui et al., 2005).

Коэффициент распределения солюбилизируемого вещества между мицеллами и водой – это отношение его растворимости в мицеллярном растворе к его растворимости в воде (8):

$$P = \frac{S_{\text{общ}} - S_w}{S_w} \quad (8),$$

где $S_{\text{общ}}$ – общая растворимость солюбилизируемого вещества, S_w – его растворимость в воде.

Была оценена растворимость используемых субстратов БАПНА и БТНА в воде (S_w) и в водных растворах геминальных ПАВ (S_M). Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Солюбилизация БТНА и БАПНА в водных растворах ППАВ
($C_{\text{ПАВ}}=1\text{мМ}$)

Субстрат	ПАВ	P
БТНА	m=6	136
	m=8	101
	m=12	46
	n=10	0.47
	n=12	0.21
	n=16	77
БАПНА	m=6	0.94
	m=8	1.31
	m=12	1.24
	n=10	-
	n=12	0.34
	n=16	0.31

Растворы гидроксилсодержащего геминального ПАВ с субстратом БТНА характеризуются более высоким коэффициентом распределения солюбилизирующего вещества между мицеллами и водой, также наблюдается достаточно большая растворимость БТНА с n=16.

Наименьшая растворимость наблюдается в среде немицеллизованных геминальных ПАВ (n=10, 12). В мицеллярных растворах исследованных соединений с БТНА происходит концентрирование субстрата вследствие его солюбилизации. Полученные данные, отражающие растворимость исследуемых субстратов, свидетельствуют об увеличении солюбилизирующего действия в ряду немицеллизованные ПАВ < мицеллизованные ПАВ (Раздел 2.1.2., таблица 1). Растворимость БАПНА в растворах геминальных ПАВ существенно ниже.

Таким образом, организация микрогетерогенных систем неодинакова для исследуемых геминальных ПАВ, что является причиной различной солюбилизации в системе молекул субстратов. Изменение растворимости субстратов в растворах ПАВ должно находить отражение в реакционной способности исследуемых белков.

Одним из методов, примененных в данной работе к оценке комплексообразования геминальных ПАВ с белками, было динамическое светорассеяние. Динамическое светорассеяние - один из наиболее простых и распространенных методов определения размеров частиц в водных растворах, применимый для систем с размерами частиц от единиц нанометров до нескольких микрометров, который по флуктуации интенсивности рассеянного излучения позволяет получить коэффициент самодиффузии частиц и рассчитать их гидродинамический диаметр (Alexander, Dalgleish, 2006 Gangnard et al., 2007).

Согласно данным по динамическому светорассеянию геминальные ПАВ в водном растворе существуют в виде ассоциатов или мицелл (Faustino et al., 2009), размеры которых увеличиваются с ростом длины алкильного радикала ПАВ (рис. 35) и уменьшаются с ростом длины спейсерного фрагмента ПАВ (рис. 36) (Sharma et al., 2004). При этом средний гидродинамический диаметр комплексов ПАВ-белок на 15-25% превышает размер мицелл и размер молекулы белка.

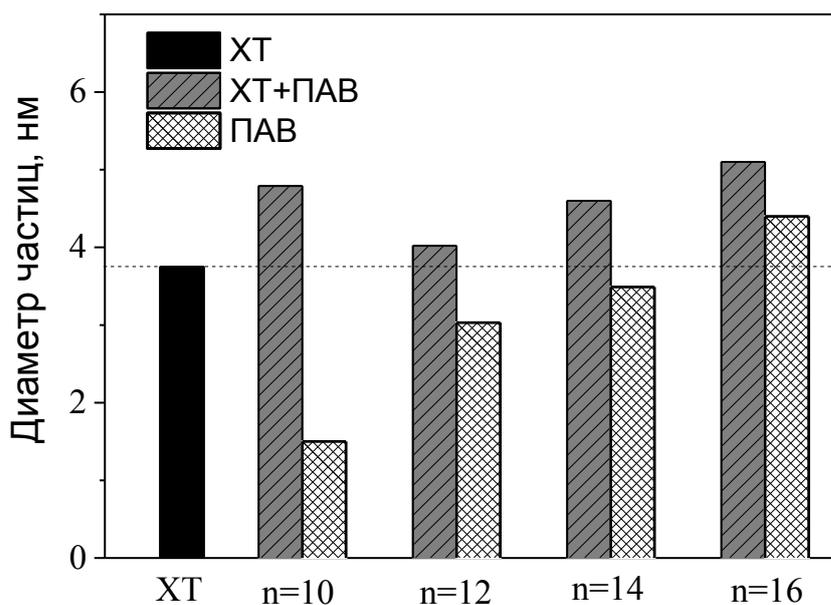


Рис. 35. Средний гидродинамический диаметр агрегатов α -химотрипсина с геминальными ПАВ с метильными заместителями в головной группе.

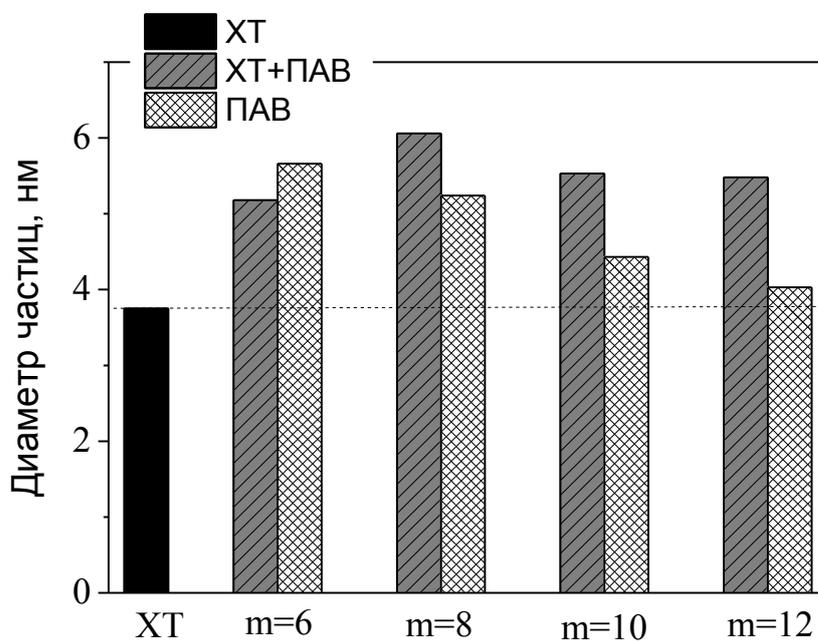


Рис. 36. Средний гидродинамический диаметр агрегатов α -химотрипсина с геминальными ПАВ с гидроксиэтильными заместителями в головной группе.

4.2. Структура и каталитическая активность трипсина и α -химотрипсина в растворах геминальных ПАВ с метильными заместителями в головных группах

Каталитическая активность трипсина и α -химотрипсина в растворах геминальных ПАВ с метильными заместителями в головных группах. Следующим этапом работы было исследование регуляторного действия геминальных ПАВ с метильным заместителем в головной группе, различающихся длиной алкильных радикалов, на структуру и каталитическую активность трипсина и α -химотрипсина. На рисунках 37 и 38 представлены зависимости активности трипсина и α -химотрипсина в растворах геминальных ПАВ, соответственно. Как видно из представленных данных характер зависимостей активности исследуемых ферментов кардинально различается. В растворах трипсина геминальные ПАВ оказывают лишь небольшое ингибирующее действие, которое не зависит от длины алкильного радикала ПАВ (рис. 37). Влияние геминальных ПАВ на α -химотрипсин более выражено. Интересно отметить, что в присутствии ПАВ с длиной алкильного радикала $n=10$ и 12 происходит увеличение скорости реакции на порядок по сравнению с реакцией в буфере, в то время как в присутствии ПАВ с более длинными алкильными радикалами ($n=14$ и 16) ее уменьшение (рис. 38).

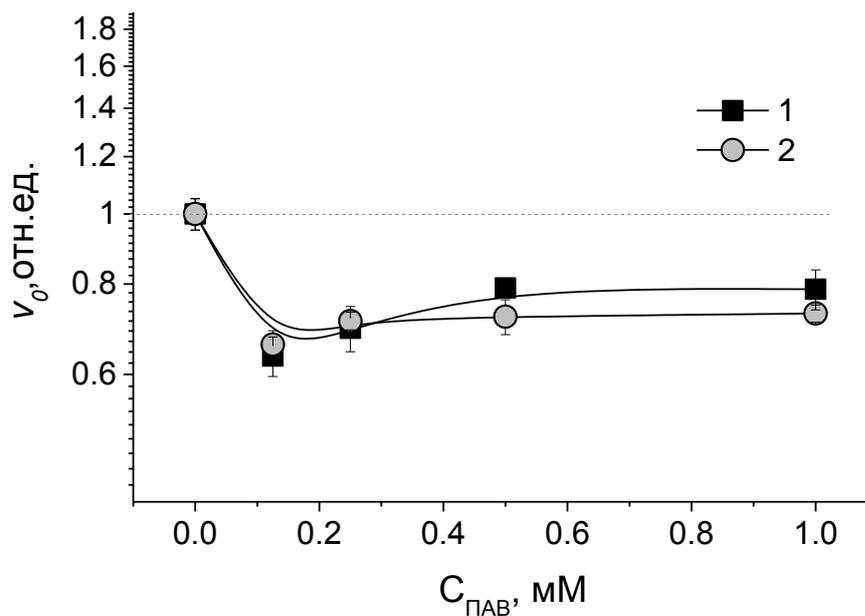


Рис. 37. Зависимость относительной начальной скорости реакции гидролиза БАПНА в присутствии трипсина от концентрации ГПАВ: $n=16$ (1); 10 (2). Начальная скорость реакции в буферном растворе 1.3 мкМ/с .

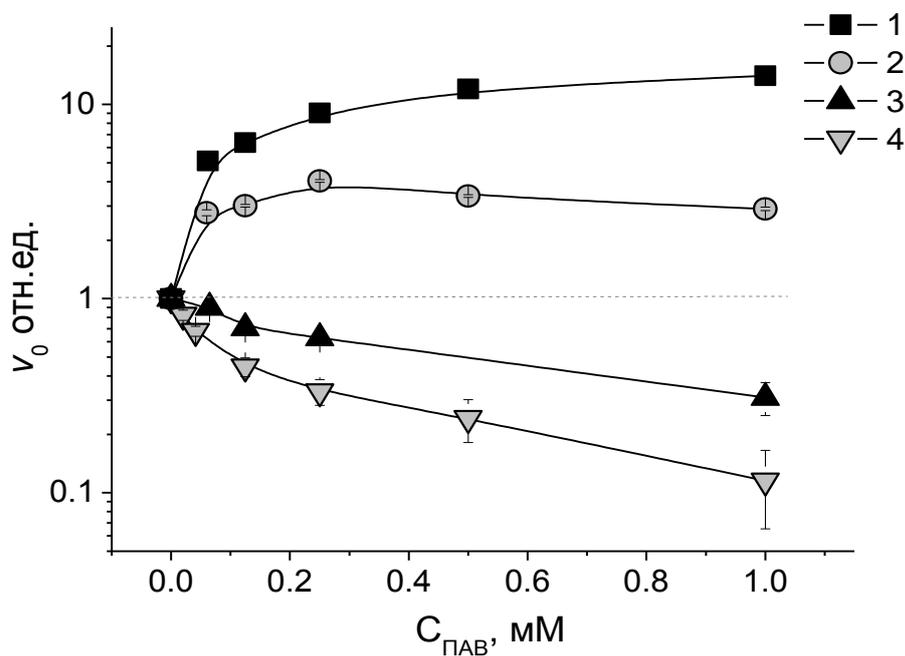
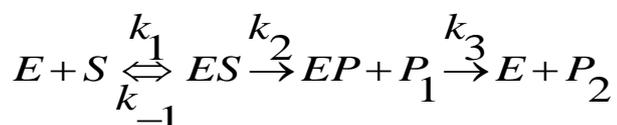


Рис. 38. Зависимость относительной начальной скорости реакции гидролиза БТНА в присутствии α -химотрипсина от концентрации ГПАВ: $n=10$ (1); 12 (2); 14 (3); 16 (4). Начальная скорость реакции в буферном растворе 0.07 мкМ/с .

Для объяснения наблюдаемых изменений активности фермента в растворах геминальных ПАВ с метильным заместителем в головной группе были определены кинетические параметры реакции согласно теории Михаэлиса-Ментен.

Напомним, что в случае сериновых протеаз механизм классической ферментативной реакции представляет собой следующий трехстадийный процесс с соответствующими константами скоростей для каждой стадии: образование фермент-субстратного комплекса k_1 , распад комплекса k_{-1} , процесс ацилирования фермента k_2 и его деацилирования k_3 :



где E -фермент, S – субстрат, ES – фермент-субстратный комплекс, P_1 , P_2 – продукты реакции.

Было использовано уравнение Михаэлиса-Ментен, которое является фундаментальным уравнением в ферментативной кинетике:

$$v_0 = \frac{V_m [S]_0}{K_M + [S]_0} \quad (9),$$

где v_0 - начальная скорость реакции, $[S]_0$ – исходная концентрация субстрата, V_m -максимальная скорость реакции, K_M -константа Михаэлиса (Корниш Боуден, 1979).

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (10),$$

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (11).$$

Важно отметить, что константа Михаэлиса является мерой истинной константы связывания K_S , только при $k_{-1} \gg k_2$, поэтому анализировать величину K_M с точки зрения связывания субстрата и фермента надо с осторожностью. Кроме того, как уже упоминалось во второй главе, уравнение Михаэлиса-Ментен было предложено для ферментативных реакций, протекающих в гомогенной среде. В мицеллярных же системах, возможно распределение субстрата между фазами системы и наблюдаемое изменение K_M может быть связано не с изменением истинных каталитических свойств фермента, а обусловлено эффектом перераспределения субстрата (Хмельницкий и др., 1989).

В таблице 3 приведены кинетические параметры реакции ферментативного гидролиза БТНА и БАПНА: V_m , K_M , k_{cat} – каталитические константы реакции и k_{cat}/K_M – эффективность катализа при добавлении в раствор $n=10$ и $n=16$.

Таблица 3. Максимальная скорость (V_m), константа Михаэлиса (K_M), каталитическая константа (k_{cat}) и эффективность катализа (k_{cat}/K_M) реакции гидролиза БАПНА, БТНА трипсином, α -химотрипсином*

Система	V_m , мкМ/с	$K_M \cdot 10^{-4}$, М	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , М ⁻¹ с ⁻¹
трипсин	3.4	17.9	1.86	1039
трипсин+ГПАВ(n=16)	3.2	23	1.75	761
трипсин+ГПАВ(n=10)	3.3	17.9	1.72	961
α -химотрипсин	0.15	0.7	0.15	2143
α -химотрипсин+ГПАВ(n=16)	0.03	0.85	0.03	365
α -химотрипсин+ГПАВ(n=10)	3.3	0.4	3.3	82500

*Концентрация ПАВ – 1 мМ

Величины V_m и k_{cat} отражают истинную реакционную способность ферментов, в то время как на K_M влияет характер распределения реагентов. Константа Михаэлиса (K_M), характеризующая сродство фермента к субстрату, в случае трипсина незначительно варьируется в присутствии геминальных ПАВ с различными n . Во всех исследованных системах с трипсином наблюдается снижение максимальной скорости реакции и эффективности катализа, что, может быть, вызвано изменением в структуре фермента.

Для α -химотрипсина по сравнению с контролем (буферный раствор) наблюдается уменьшение (для $n=10$) или увеличение (для $n=16$) константы Михаэлиса. В то же время эффективность катализа (k_{cat}/K_M) существенно увеличивается в присутствии геминального ПАВ с $n=10$ и уменьшается при $n=16$.

Также известно (Беляева, Еремеев, 2000), что для нитроанилидных субстратов используемых в данной работе скорость-лимитирующей стадией является образование ацил-фермента, характеризующееся константой скорости k_2 . Вследствие этого для α -химотрипсина значительное изменение k_{cat} в присутствии геминальных ПАВ (табл. 3) говорит о влиянии ПАВ на скорость лимитирующую стадию образования ацилферментного комплекса. Изменение скоростей образования и распада ацил-ферментного комплекса может быть вызвано изменением подвижности аминокислотных остатков активного центра белка или изменением доступности активного центра для молекул воды как результат модуляции структуры фермента при взаимодействии с ПАВ.

Структура трипсина и α -химотрипсина в растворах геминальных ПАВ с метильными заместителями в головных группах.

Было сделано предположение, что присутствие геминальных ПАВ изменяет конформацию белков, что в свою очередь приводит к изменению активности трипсина и α -химотрипсина. Для проверки этой гипотезы были привлечены традиционные методы флуоресцентной и ИК- спектроскопии.

Детальный анализ спектров триптофановой флуоресценции белков в буферном (контрольном) растворе и в растворах геминальных ПАВ показал, что характер влияния ПАВ на интенсивность триптофановой флуоресценции трипсина и α -химотрипсина зависит от длины алкильного радикала (рис. 39, 40). Соотношение (F/F_0) , где F_0 характеризует интенсивность триптофановой флуоресценции в буфере, а F – в растворе ПАВ, служит параметром, позволяющим оценить влияние среды. Показано, что геминальный ПАВ с $n=10$ вызывает тушение флуоресценции во всем диапазоне исследованных концентраций (рис. 39, 40), не влияя на положение максимума по длине волны (рис. 41, 42). Однако геминальные ПАВ с более длинными алкильными радикалами вызывают рост интенсивности флуоресценции белков и сдвиг максимума флуоресценции в область более высоких длин волн.

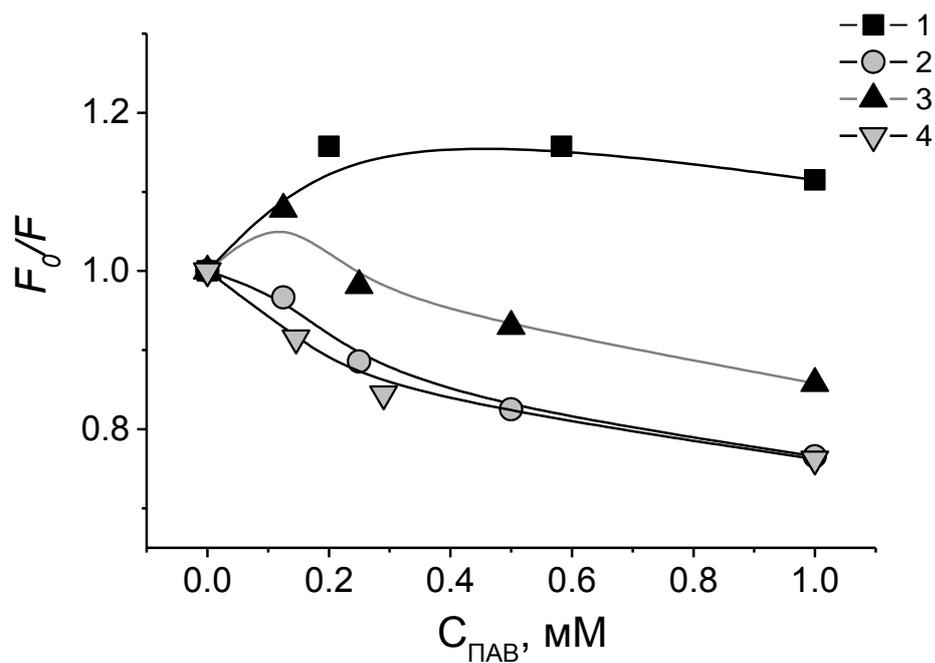


Рис. 39. Зависимость интенсивности триптофановой флуоресценции α -химотрипсина от концентрации ГПАВ: $n=10$ (1); 12 (2); 14 (3); 16 (4).

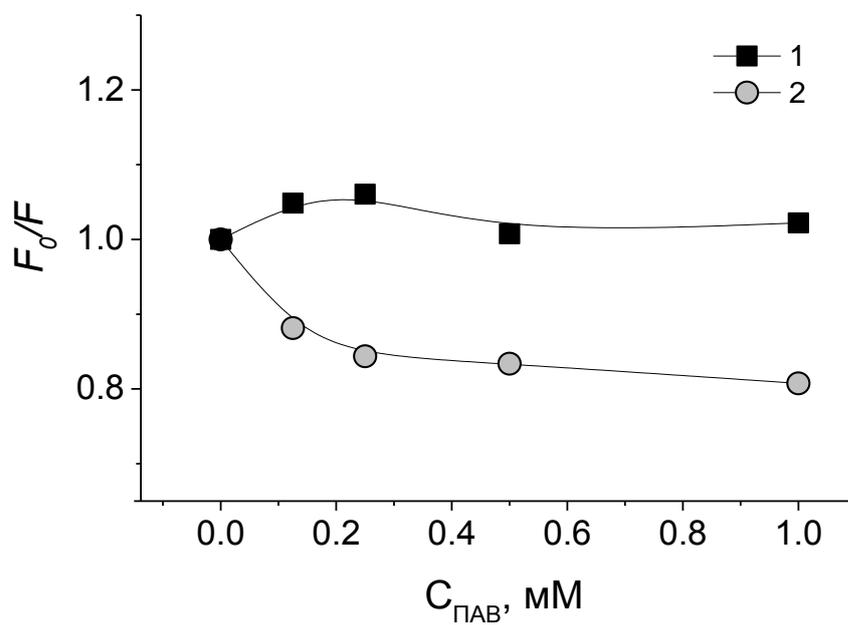


Рис. 40. Зависимость интенсивности триптофановой флуоресценции трипсина от концентрации геминальных ПАВ: $n=10$ (1); 16 (2).

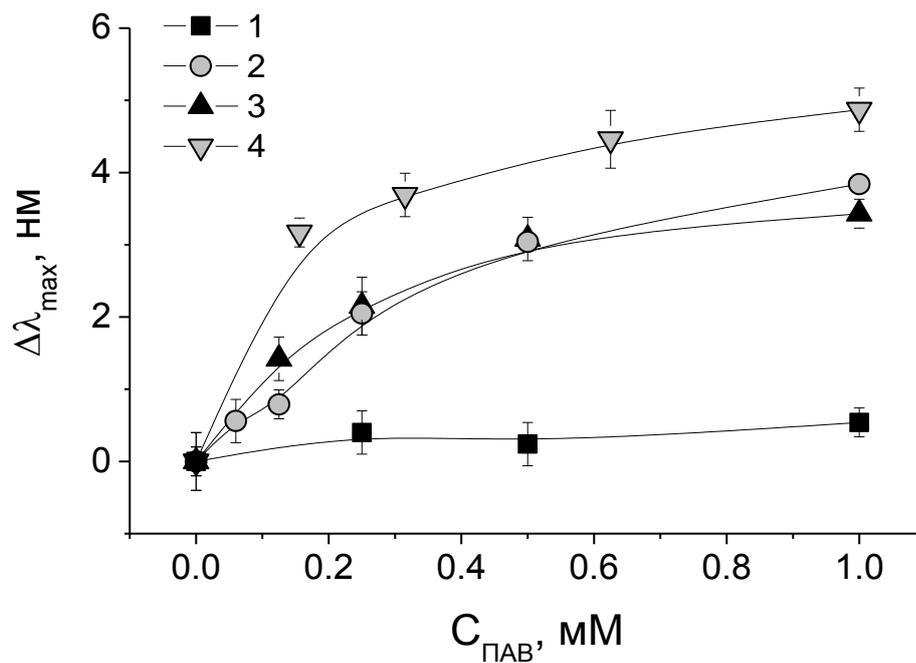


Рис. 41. Смещение максимума длины волны триптофановой флуоресценции α -химотрипсина от концентрации геминальных ПАВ: $n=10$ (1); 12 (2); 14 (3); 16 (4).

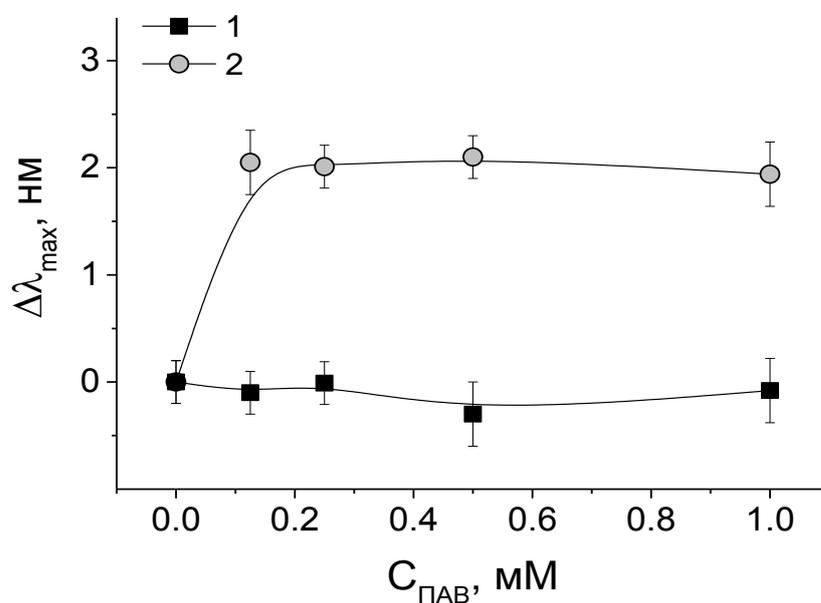


Рис. 42. Смещение максимума длины волны триптофановой флуоресценции трипсина от концентрации геминальных ПАВ: $n=10$ (1); 16 (2).

Увеличение интенсивности флуоресценции может быть обусловлено как разворачиванием белка и удалением соседних групп–тушителей от хромофора, так и переходом поверхностных триптофановых остатков в более гидрофобное окружение. Увеличение длины волны флуоресценции может быть связано как с увеличением доступности воде внутренних триптофанов при разворачивании глобулы, так и изменением состояния поверхностных групп белка. Поскольку в состав молекул трипсина и α -химотрипсина входят 4 и 8 остатков триптофана, соответственно, то большое число триптофановых остатков и их гетерогенность по доступности растворителю не позволяют дать однозначную интерпретацию наблюдаемых изменений параметров флуоресценции. Следует отметить, что в водных растворах белков одновременный рост интенсивности и длины волны флуоресценции связывают с денатурацией фермента (Решетняк, 1997). В случае α -химотрипсина можно отметить, что зависимость начальной скорости реакции от концентрации и структуры геминальных ПАВ демонстрирует обратную корреляцию с интенсивностью флуоресценции (рис. 39).

Таким образом, уменьшение скорости реакции может объясняться денатурацией части молекул фермента. В то же время, рост активности, наблюдаемый при неизменности конформации фермента, должен иметь иные причины.

Для оценки изменений во вторичной структуре трипсина и α -химотрипсина, вызванных взаимодействием с молекулами геминальных ПАВ с метильным заместителем в головной группе, был привлечен метод ИК-спектроскопии. На рисунке 43 и 44 приведены спектры поглощения белков в растворах исследуемых геминальных ПАВ. Качественно изменения в спектрах трипсина и α -химотрипсина под действием геминальных ПАВ схожи и проявляются в высокочастотном сдвиге (ВЧ) положения максимума полосы амид I и ее уширении по мере увеличения длины алкильной цепи (рис. 43, 44).

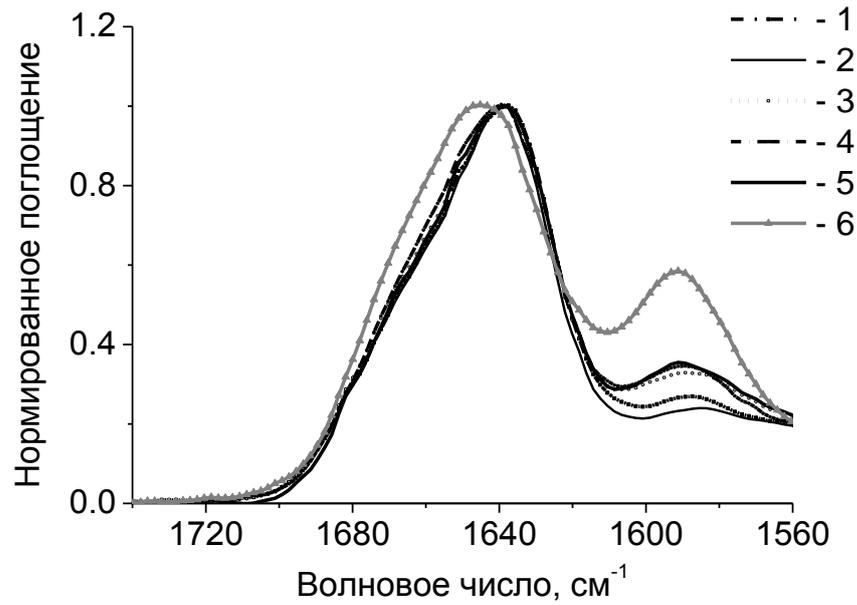


Рис. 43. Инфракрасные спектры поглощения α -химотрипсина в буферном (D_2O) растворе и растворах геминальных ПАВ: спектр α -химотрипсина денатурированного автолизом (1); нативного α -химотрипсина (2); $n=10$ (3); $n=12$ (4); $n=14$ (5); $n=16$ (6). Спектры нормированы к 1 в максимуме полосы амид I.

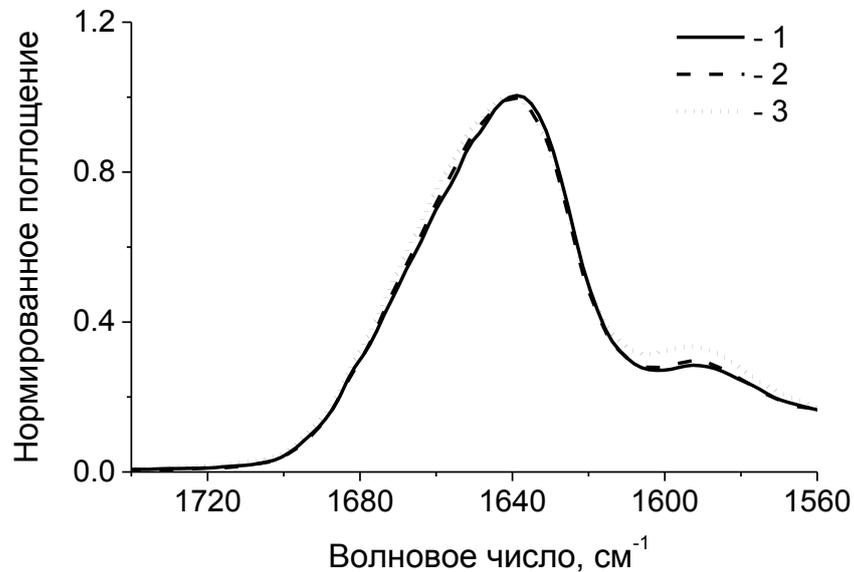


Рис. 44. Инфракрасные спектры поглощения трипсина в буферном (D_2O) растворе и растворах геминальных ПАВ: спектр нативного трипсина (1); $n=10$ (2); $n=16$ (3). Спектры нормированы к 1 в максимуме полосы амид I.

Анализ данных ИК-спектров показал, что в молекулах белков в растворах геминальных ПАВ наблюдается изменение вторичной структуры, происходит уменьшение количества α -спиралей и β -слоев и увеличение неупорядоченной структуры (рис. 45). Сильнее всего эти изменения выражены в спектрах α -химотрипсина (рис. 45 А) и влияние ПАВ, находящихся в мицеллярной форме ($n=14$, $n=16$), более выражено. В спектрах трипсина, присутствие геминальных ПАВ вызывает небольшие и примерно равные изменения во вторичной структуре, большее влияние оказывает геминальный ПАВ с $n=16$ (рис. 45 Б).

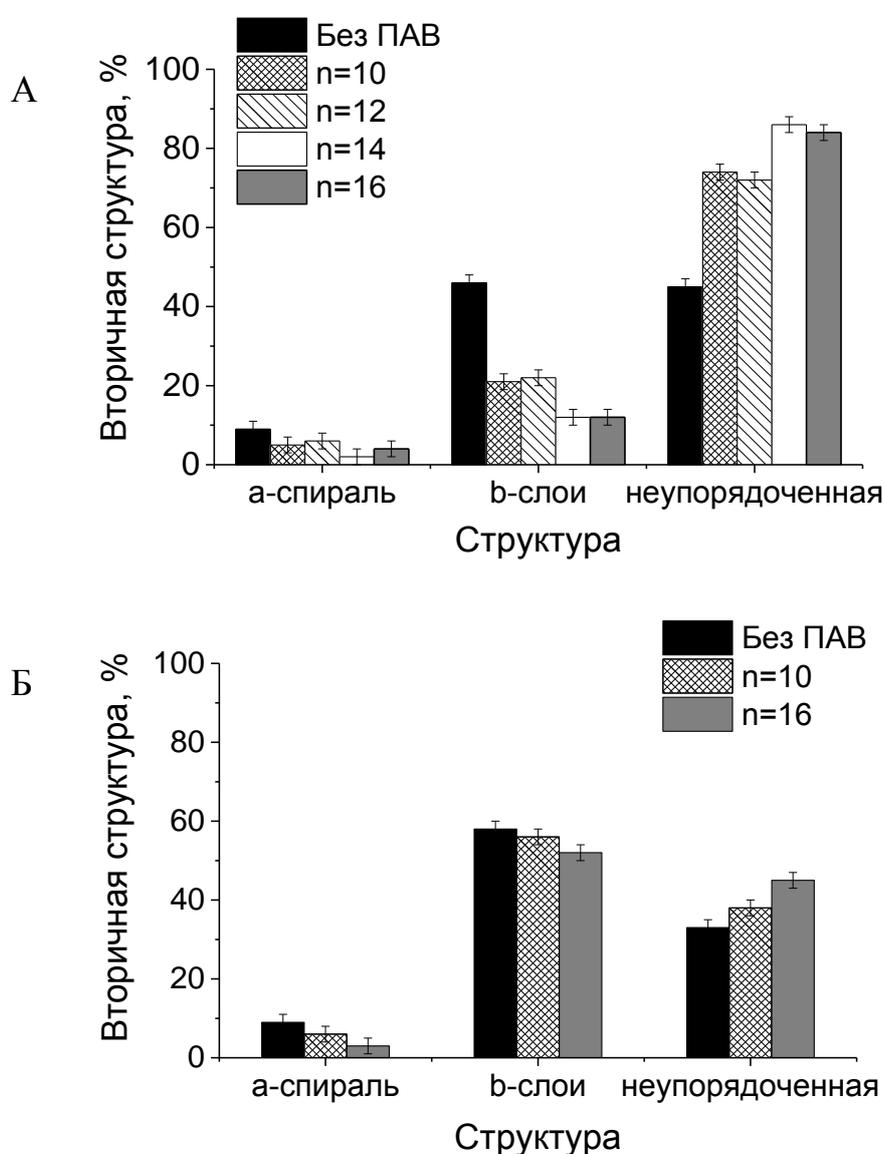


Рис. 45. Содержание компонент вторичной структуры α -химотрипсина (А) и трипсина (Б).

На рисунках 46, 47, 48 приведены формализованные зависимости спектральных параметров белков от структуры ПАВ, позволяющие количественно оценить влияние химической структуры ПАВ на вторичную структуру трипсина и α -химотрипсина. Для сравнения приведены данные для химотрипсина, подвергшегося частичному автолизу в результате 24-часовой инкубации при 25°C (рис. 47, 48).

В случае трипсина (рис. 46), малое число точек при довольно большом их разбросе затрудняет выявление какой-то зависимости. Поэтому на следующих рисунках приведены данные для α -химотрипсина. Сопоставление обеих совокупностей данных позволяет с большей определенностью судить о влиянии химической структуры ПАВ на вторичную структуру белка.

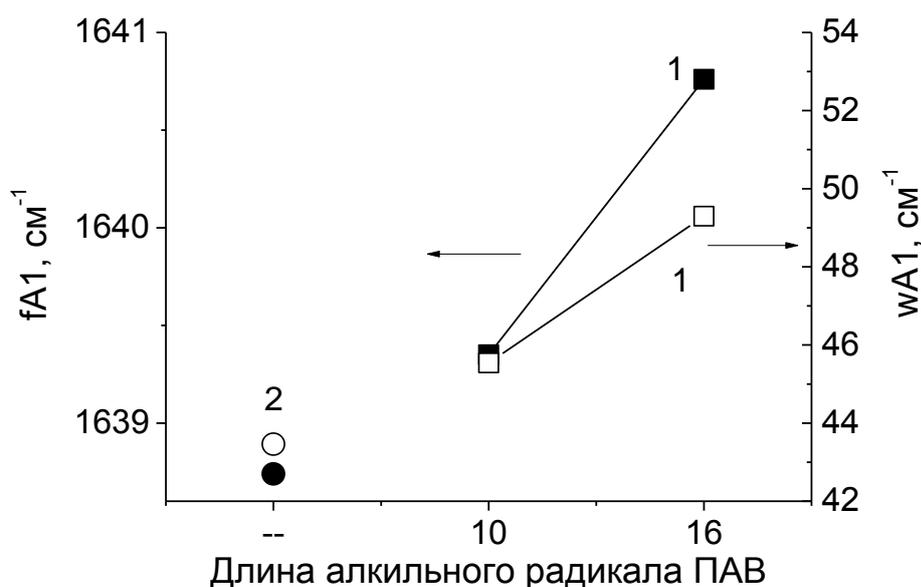


Рис. 46. Зависимость частоты максимума (темные символы, левая шкала) и ширины на полувысоте (светлые символы, правая шкала) полосы амид I трипсина от длины алкильного радикала геминального ПАВ (1), трипсин в буферном растворе (2).

Анализ спектров по второй производной показывает, что высокочастотный (ВЧ) сдвиг и рост ширины обусловлены распадом части нативной β -структуры α -химотрипсина при 1636 см^{-1} и увеличением поглощения неупорядоченной структуры при $1640\text{-}46 \text{ см}^{-1}$. Исключение составляет система химотрипсин/ГПАВ($n=10$), где по сравнению с контролем (буферный раствор) наблюдается некоторое сужение полосы амид I (рис. 47).

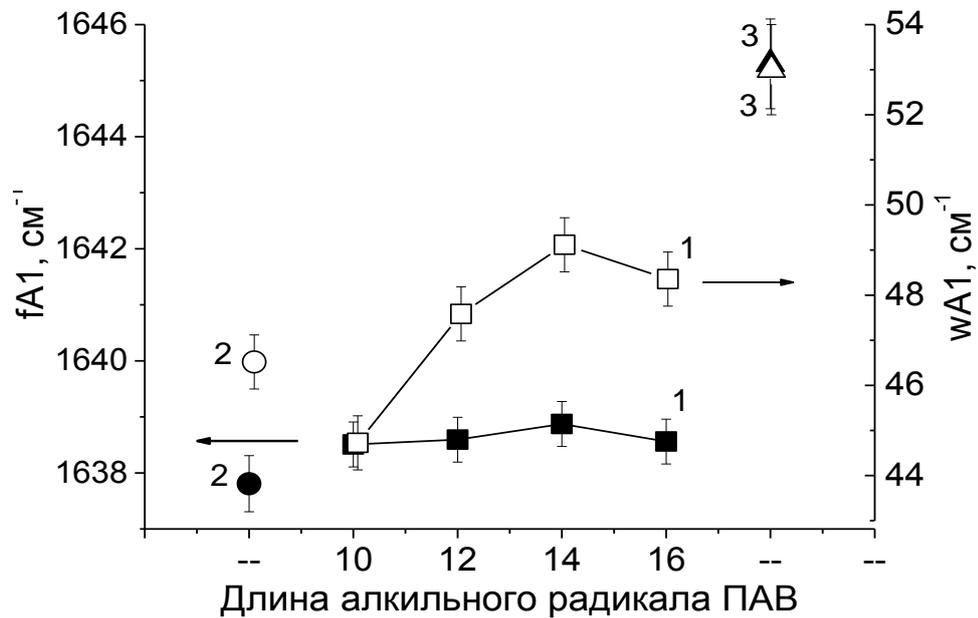


Рис. 47. Зависимость частоты максимума (темные символы, левая шкала) и ширины на полувысоте (светлые символы, правая шкала) полосы амид I α -химотрипсина от длины алкильного радикала геминального ПАВ (1), в буферном растворе (2), денатурированного автолизом (3).

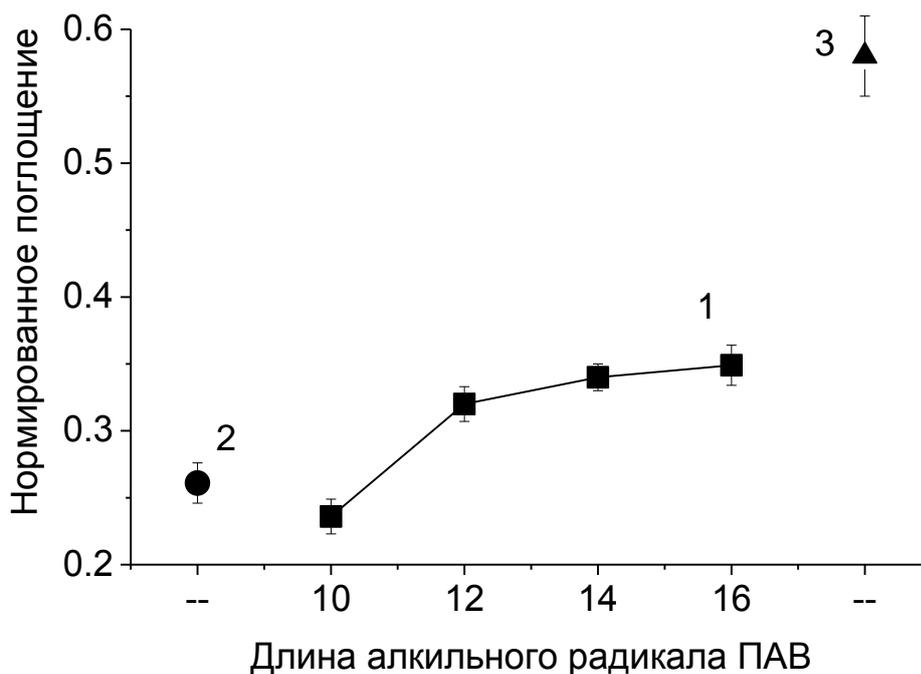


Рис. 48. Зависимость нормированной интенсивности поглощения концевых ионизованных карбоксилов белка от длины алкильного радикала ГПАВ (1) в буферном растворе (2), денатурированного автолизом (3).

Сравнение зависимостей, приведенных на рисунках 47 и 48, показывает корреляцию между положением максимума полосы амид I, ее шириной и интенсивностью поглощения концевых карбоксилов. Другими словами, чем сильнее спектр белка в системе с ПАВ отличается от контроля, тем выше оказывается концентрация концевых групп. Отсюда следует, что наблюдаемые изменения в структуре белка носят денатурационный характер и, в свою очередь, ускоряют процесс автолиза.

С другой стороны, денатурационные изменения в структуре белков зависят от структуры геминальных ПАВ, так как усиливаются при увеличении длины алкильных радикалов от 10 до 16 метиленовых групп.

Состояние ПАВ в растворе можно оценить по положению максимума поглощения CH_2 -групп. При образовании мицелл частота CH_2 -групп понижается от ее значения в мономерном состоянии, что хорошо прослеживается по зависимостям на рисунке 49.

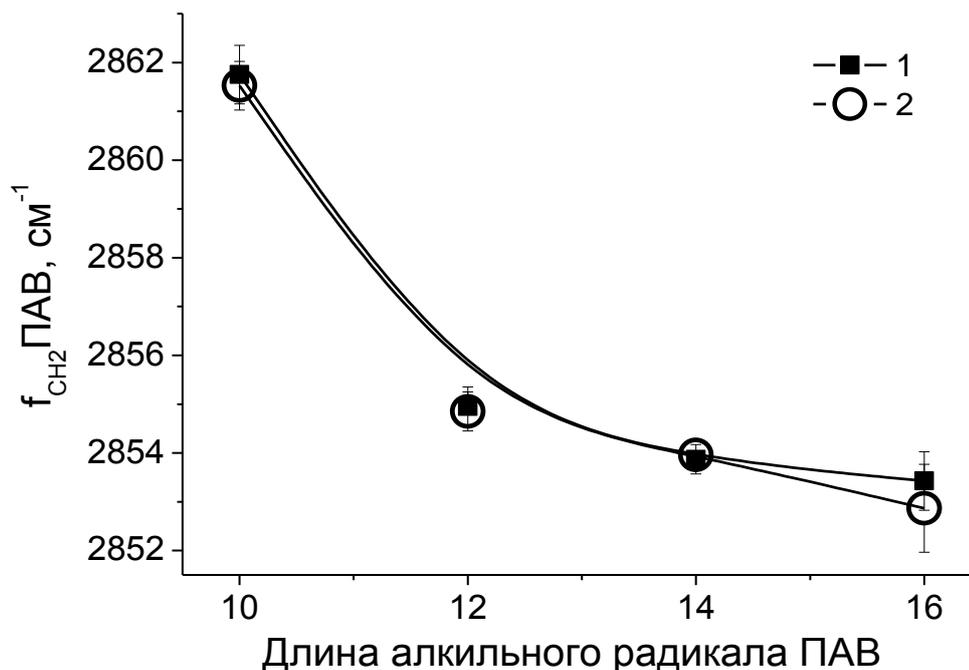


Рис. 49. Соотношение между положением максимума симметричного валентного колебания CH₂-групп в ИК-спектрах ГПАВ и длиной алкильного радикала соответствующего ПАВ в растворе (1), в присутствии белка (2).

Понижение частоты CH₂ групп геминальных ПАВ с ростом длины алкильного радикала указывает на переход из мономерного в мицеллярное состояние. При увеличении длины алкильных радикалов геминальных ПАВ усиливается и низкочастотный сдвиг полосы поглощения, свидетельствуя о соответствующем увеличении гидрофобности мицелл. Присутствие белка в растворе геминальных ПАВ не оказывает заметного влияния на частоты поглощения CH₂ групп.

На рисунке 50 сопоставлены изменение ККМ метилсодержащих геминальных ПАВ с различной длиной алкильного радикала и относительной начальной скорости ферментативной реакции в зависимости от длины алкильного радикала при концентрации ПАВ 0.5 мМ.

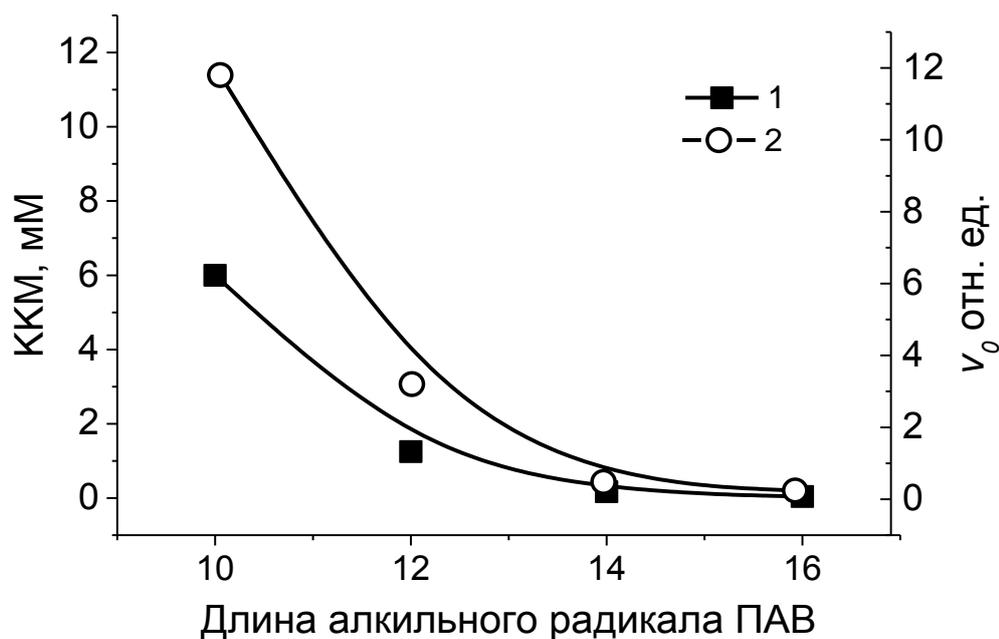


Рис. 50. Изменение ККМ геминальных ПАВ (1) и относительной начальной скорости реакции (2) в зависимости от длины алкильного радикала.

Увеличение количества групп CH_2 в углеводородных радикалах приводит к резкому уменьшению ККМ и, в тоже время, к падению активности фермента. Между обеими величинами наблюдается пропорциональная зависимость, из чего можно сделать вывод, что отрицательное влияние на активность фермента оказывает именно рост количества мицеллизованного ПАВ.

Таким образом, проведенные исследования показали, что геминальные алкиламмонийные ПАВ с метильным заместителем в головной группе, различающиеся длиной алкильного радикала, оказывают заметное влияние на скорость ферментативного гидролиза. Характер такого влияния зависит от длины алкильного радикала и от агрегатного состояния геминальных ПАВ. В случае трипсина в присутствии всего ряда геминальных ПАВ наблюдается уменьшение активности, что связано с изменениями в структуре белка.

В случае α -химотрипсина геминальные ПАВ с метильным фрагментом в головной группе в мономерной форме взаимодействуют с белком, индуцируя

изменения в его структуре, которые усиливают каталитическую активность фермента. В то же время, в присутствии мицеллизованного ПАВ происходит перераспределение субстрата между объемной и мицеллярной фазами раствора, что приводит к уменьшению скорости образования фермент-субстратного комплекса для геминальных ПАВ с длиной алкильного радикала больше 12.

В тоже время, можно в целом говорить о регуляторном действии геминальных ПАВ с различной длиной алкильного радикала на работу фермента, и если вспомнить об определенной аналогии в строении этих ПАВ с липидными молекулами, изучение гибридных структур «геминальный ПАВ - фермент» может быть достаточно перспективным как в фундаментальном, так и прикладном плане.

4.3. Структура и каталитическая активность трипсина и α -химотрипсина в растворах гидроксилсодержащих геминальных ПАВ

Каталитическая активность трипсина и α -химотрипсина в растворах гидроксилсодержащих геминальных ПАВ.

Исследование ферментативного гидролиза специфических субстратов БТНА и БАПНА показало, что в присутствие всего ряда тестируемых гидроксилсодержащих ПАВ, различающихся длиной спейсерного фрагмента, наблюдается изменение каталитической активности белков (рис. 51, 52). Все попытки модифицировать каталитическую систему трипсина геминальными ПАВ приводили к уменьшению активности фермента по сравнению с контрольным (буферным) раствором (рис. 51). В случае α -химотрипсина наблюдается корреляция между активностью фермента и длиной спейсерного фрагмента геминальных ПАВ. Важно отметить, что для ГПАВ с $m=10$ и $m=12$ наблюдается ускорение реакции в 5 - 8 раз по сравнению с реакцией в буфере, в то время как для ПАВ с более короткими спейсерными фрагментами ($m=14$ и $m=16$) ее замедление (рис. 52).

Для выявления молекулярных механизмов наблюдаемых изменений активности ферментов, были определены кинетические параметры реакции согласно теории Михаэлиса-Ментен. В таблице 4 приведены кинетические параметры реакции ферментативного гидролиза БТНА и БАПНА: V_m - максимальная скорость реакции, K_M - константа Михаэлиса, k_{cat} - каталитическая константа реакции и k_{cat}/K_M - эффективность катализа в присутствии гидроксилсодержащих геминальных ПАВ $m=10$ и $m=6$. Из приведенных данных видно, что сродство фермента к субстрату, характеризуемое величиной K_M практически не изменяется (таблица 4) в мицеллярных системах по сравнению с буферным раствором.

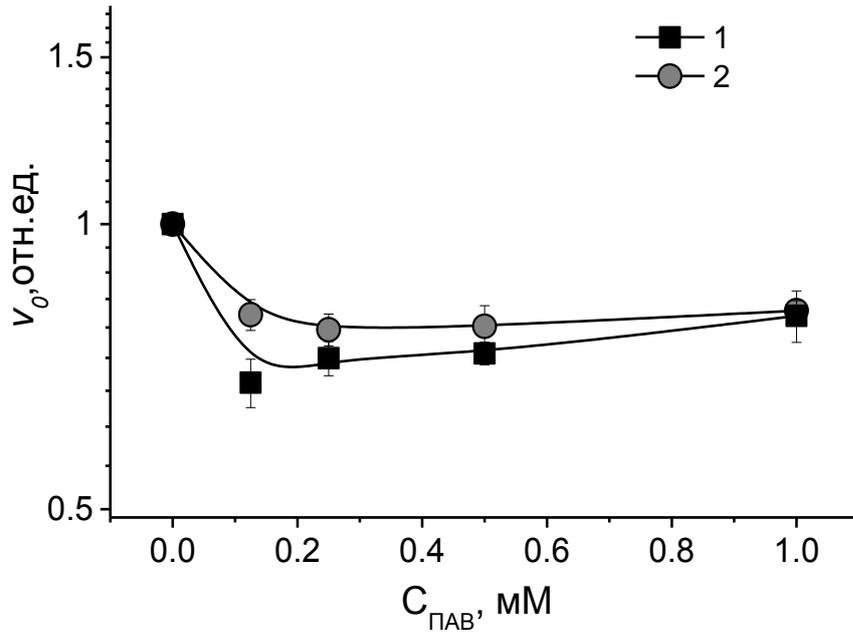


Рис. 51. Зависимость относительной начальной скорости реакции гидролиза БАПНА в присутствии трипсина от концентрации ГПАВ: $m=6$ (1), $m=10$ (2). Начальная скорость реакции в буферном растворе 1.3 мкМ/с .

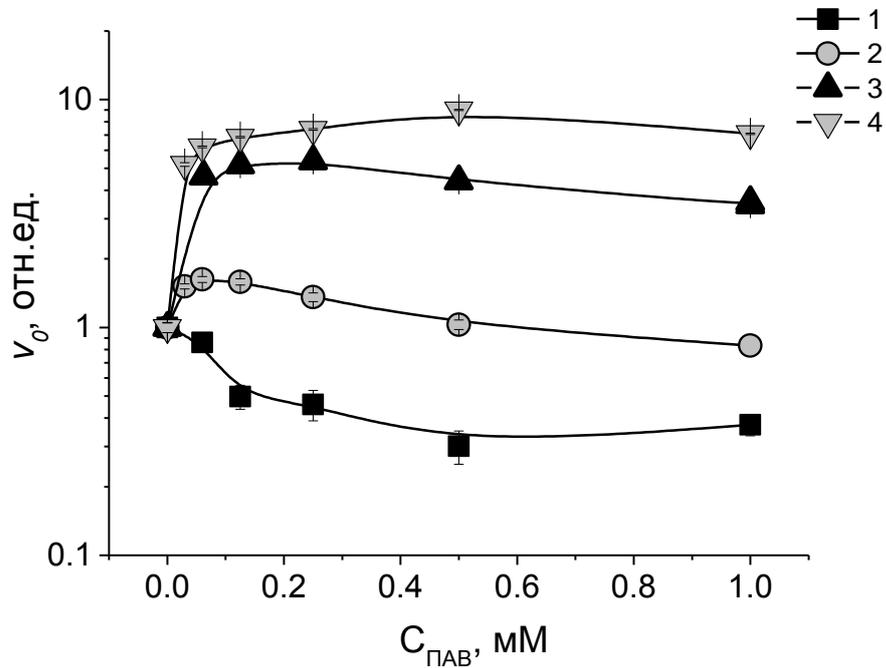


Рис. 52. Зависимость относительной начальной скорости реакции гидролиза БТНА в присутствии α -химотрипсина от концентрации ГПАВ: $m=6$ (1); 8 (2); 10 (3); 12 (4). Начальная скорость реакции в буферном растворе 0.07 мкМ/с .

Во всех исследованных системах гидроксилсодержащих геминальных ПАВ с трипсином наблюдается снижение максимальной скорости реакции и эффективности катализа, что, может быть, вызвано изменением в структуре фермента. Для α -химотрипсина по сравнению с контролем (буферный раствор) наблюдается существенное уменьшение ($m=6$) или увеличение ($m=10$) эффективности катализа. В то время как, k_{cat} , определяемая скоростью образования и распада ацил-ферментного комплекса, уменьшается в присутствии геминальных ПАВ с $m=6$ и $m=10$ с трипсином и $m=6$ с α -химотрипсином и увеличивается в присутствии ГПАВ с $m=10$ с α -химотрипсином. Вследствие этого для α -химотрипсина значительное изменение k_{cat} в присутствии геминальных ПАВ (табл. 4) говорит о влиянии ПАВ на скорость лимитирующую стадию образования ацилферментного комплекса.

Таблица 4. Максимальная скорость (V_m), константа Михаэлиса (K_M), каталитическая константа (k_{cat}) и эффективность катализа (k_{cat}/K_M) реакций гидролиза БАПНА, БТНА, катализируемых трипсином, α -химотрипсином*

Система	V_m , мкМ/с	$K_M \cdot 10^{-4}$, М	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , М ⁻¹ с ⁻¹
трипсин	3.4	17.9	1.86	1039
трипсин+ГПАВ ($m=6$)	3.1	18.2	1.69	929
трипсин+ГПАВ ($m=10$)	2.7	18	1.48	822
α -химотрипсин	0.15	0.7	0.15	2143
α -химотрипсин + ГПАВ ($m=6$)	0.04	0.83	0.04	482
α -химотрипсин + ГПАВ ($m=10$)	0.5	0.5	0.5	10000

*Концентрация ПАВ – 1 мМ

Изменение скоростей образования и распада ацил-ферментного комплекса, как и в случае с метилсодержащими геминальными ПАВ (Раздел 4.2.1.) может быть вызвано изменением подвижности аминокислотных остатков активного центра белка или изменением доступности активного центра для молекул воды при взаимодействии с ПАВ.

Структура трипсина и α -химотрипсина в растворах гидроксилсодержащих геминальных ПАВ.

Так как одной из причин сложной зависимости активности ферментов в присутствии гидроксилсодержащих геминальных ПАВ может быть нестабильность его вторичной и третичной структуры были также привлечены методы флуоресцентной и ИК спектроскопии.

Анализ спектров триптофановой флуоресценции показал, что с увеличением концентрации геминальных ПАВ происходит рост интенсивности флуоресценции α -химотрипсина (рис. 53) и трипсина (рис. 54) примерно в равной мере для всех исследованных соединений ПАВ. Одновременно наблюдается сдвиг максимума флуоресценции белков в область более высоких длин волн (рис. 55, 56).

Наблюдаемые изменения могут быть связаны с увеличением доступности воде внутренних триптофанов при разворачивании глобулы, изменением состояния поверхностных триптофановых остатков и с частичной денатурацией исследуемых белков в присутствии ПАВ.

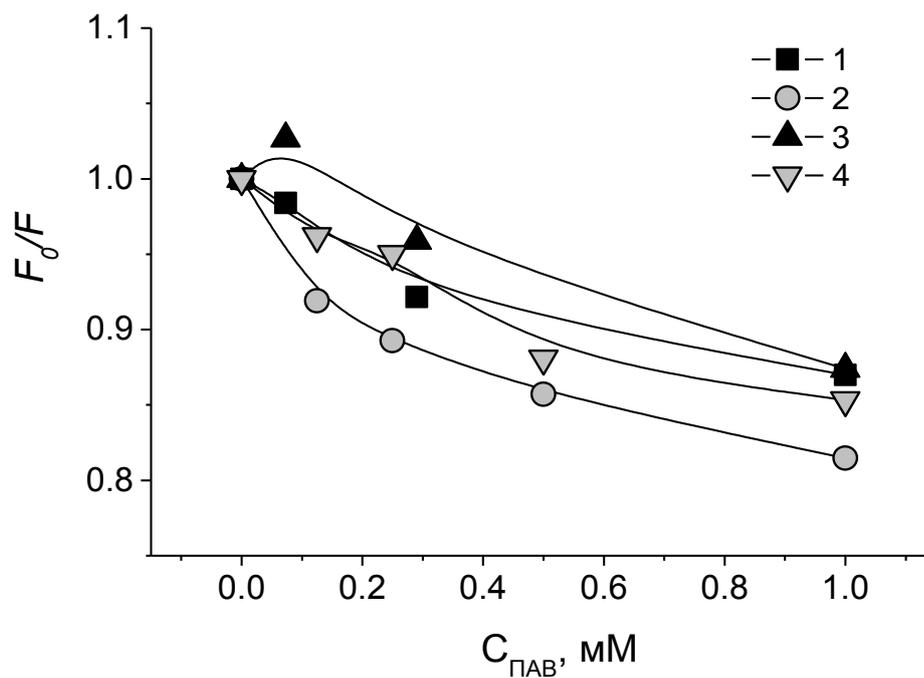


Рис. 53. Зависимость интенсивности триптофановой флуоресценции α -химотрипсина от концентрации ГПАВ: $m=6$ (1), $m=8$ (2), $m=10$ (3), $m=12$ (4).

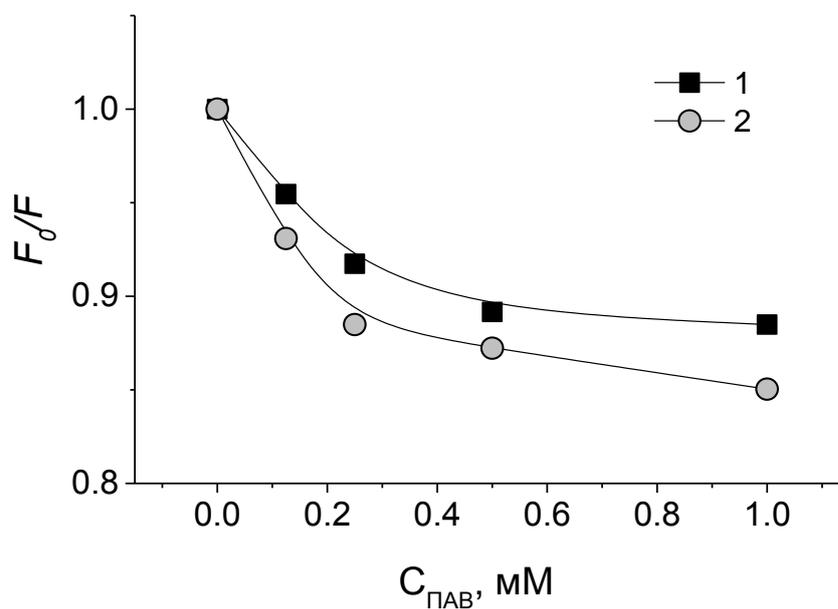


Рис. 54. Зависимость интенсивности триптофановой флуоресценции трипсина от концентрации ГПАВ: $m=6$ (1), $m=10$ (2).

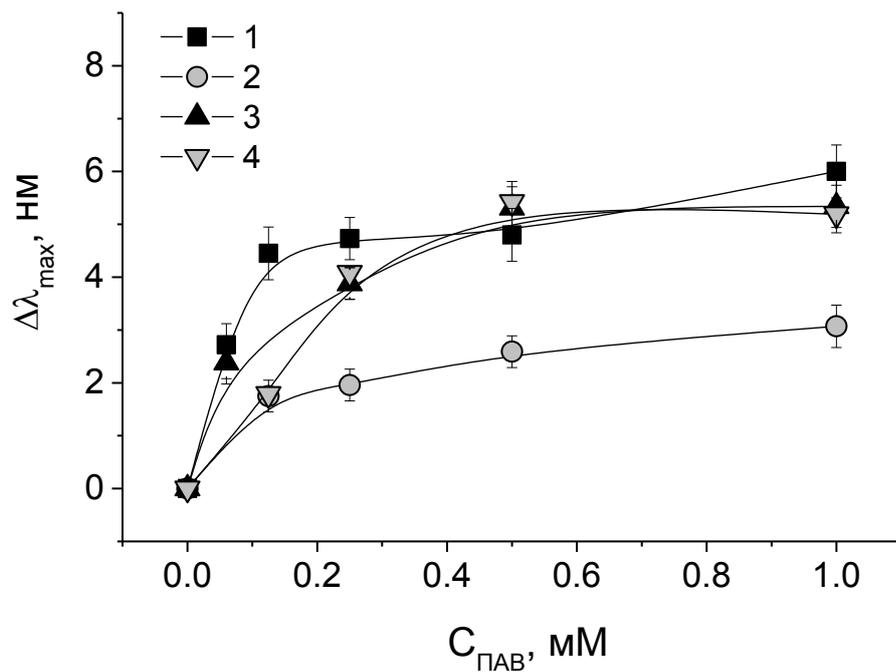


Рис. 55. Смещение максимума длины волны триптофановой флуоресценции α -химотрипсина от концентрации ГПАВ: $m=6$ (1); 8 (2); 10 (3); 12 (4).

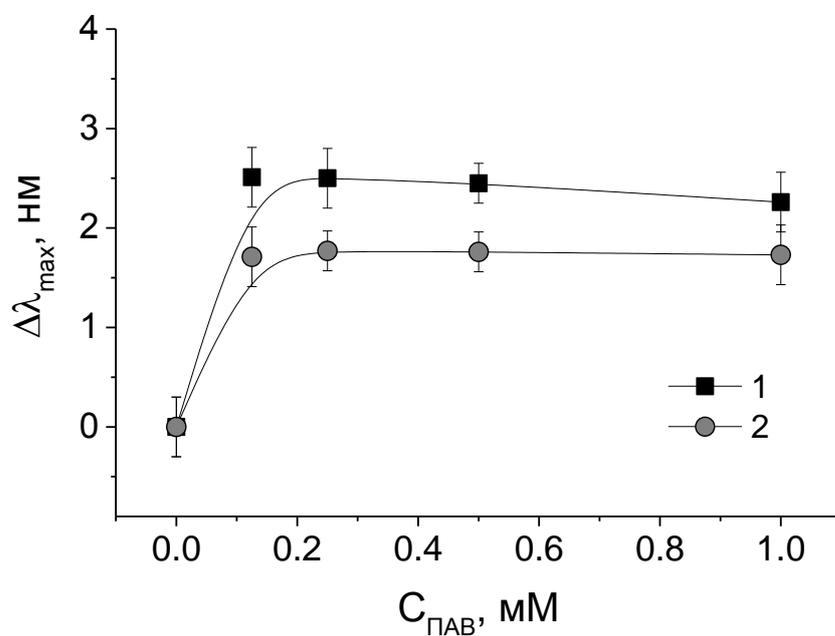


Рис. 56. Смещение максимума длины волны триптофановой флуоресценции трипсина от концентрации ГПАВ: $m=6$ (1); $m=10$ (2).

На рисунках 57 и 58 приведены ИК-спектры поглощения белков в растворах геминальных ПАВ. Для сравнения на рисунке 57 приведен спектр белка, подвергнувшегося частичному автолизу в результате 24-часовой инкубации в буфере при 25°C.

Показано, что интенсивность в максимуме полосы амид I α -химотрипсина, денатурированного автолизом, значительно понижается за счет уширения полосы в результате уменьшения содержания нативной β -структуры (1636 см^{-1}) и роста неупорядоченных структур (1646 и 1670 см^{-1}) (рис. 57). Одновременно происходит увеличение числа концевых COO^- групп, что проявляется в росте интенсивности поглощения на частоте 1590 см^{-1} (Barth, 2000).

Сравнение ИК-спектров поглощения α -химотрипсина в присутствии 4 мМ геминальных ПАВ со спектром белка, денатурированного автолизом, показывает качественное сходство наблюдаемых изменений. В тоже время денатурирующее действие геминальных ПАВ сравнительно невелико (рис. 57).

Сравнение ИК-спектров поглощения трипсина показывает, что форма полосы амид I в присутствии ПАВ изменяется: растет интенсивность поглощения концевых карбоксильных групп (1597 см^{-1}), уменьшается поглощение β -структуры (1632 см^{-1}) и увеличивается поглощение спиральной структуры (1658 см^{-1}) и β -поворотов (1670 см^{-1}) (рис. 58), но такие изменения минимальны.

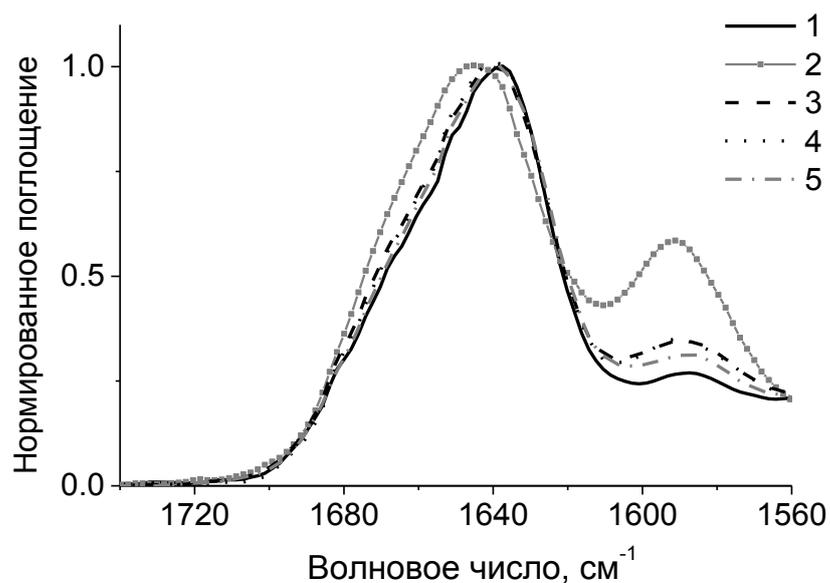


Рис. 57. Инфракрасные спектры поглощения α -химотрипсина в буферном (D_2O) растворе и растворах ГПАВ: спектр нативного α -химотрипсина (1); денатурированного автолизом (2); $m=8$ (3); $m=10$ (4); $m=12$ (5). Спектры нормированы к 1 в максимуме полосы амид I.

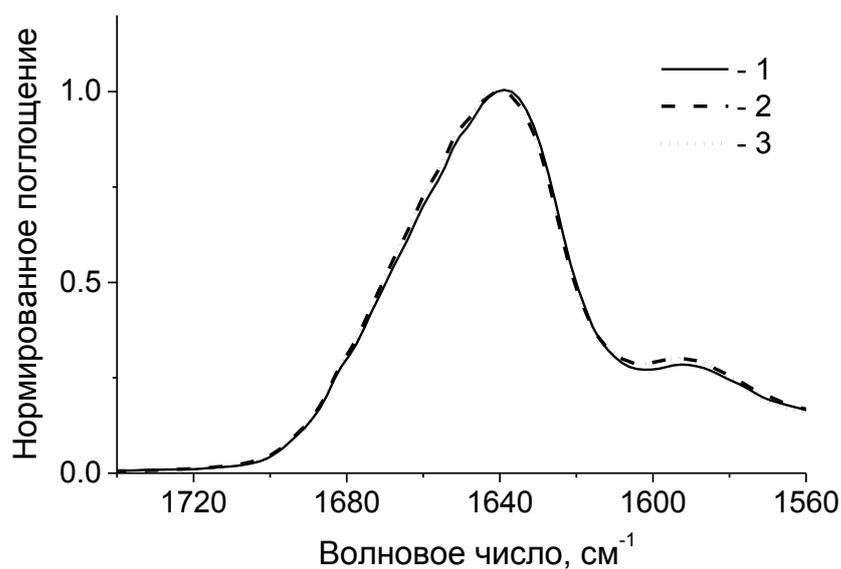


Рис. 58. Инфракрасные спектры поглощения трипсина в буферном растворе и растворах ГПАВ: спектр нативного трипсина (1), $m=6$ (2); $m=10$ (3). Спектры нормированы к 1 по максимуму полосы амид I.

Анализ ИК-спектров свидетельствует о том, вторичная структура α -химотрипсина в присутствии геминальных ПАВ отличается от нативной, количество β -структуры уменьшается (рис. 59, А), что говорит об определенных денатурационных изменениях. Величина таких изменений практически не зависит от вида гидроксилсодержащих геминальных ПАВ. Изменения во вторичной структуре трипсина в присутствии ПАВ минимальны (рис. 59, Б).

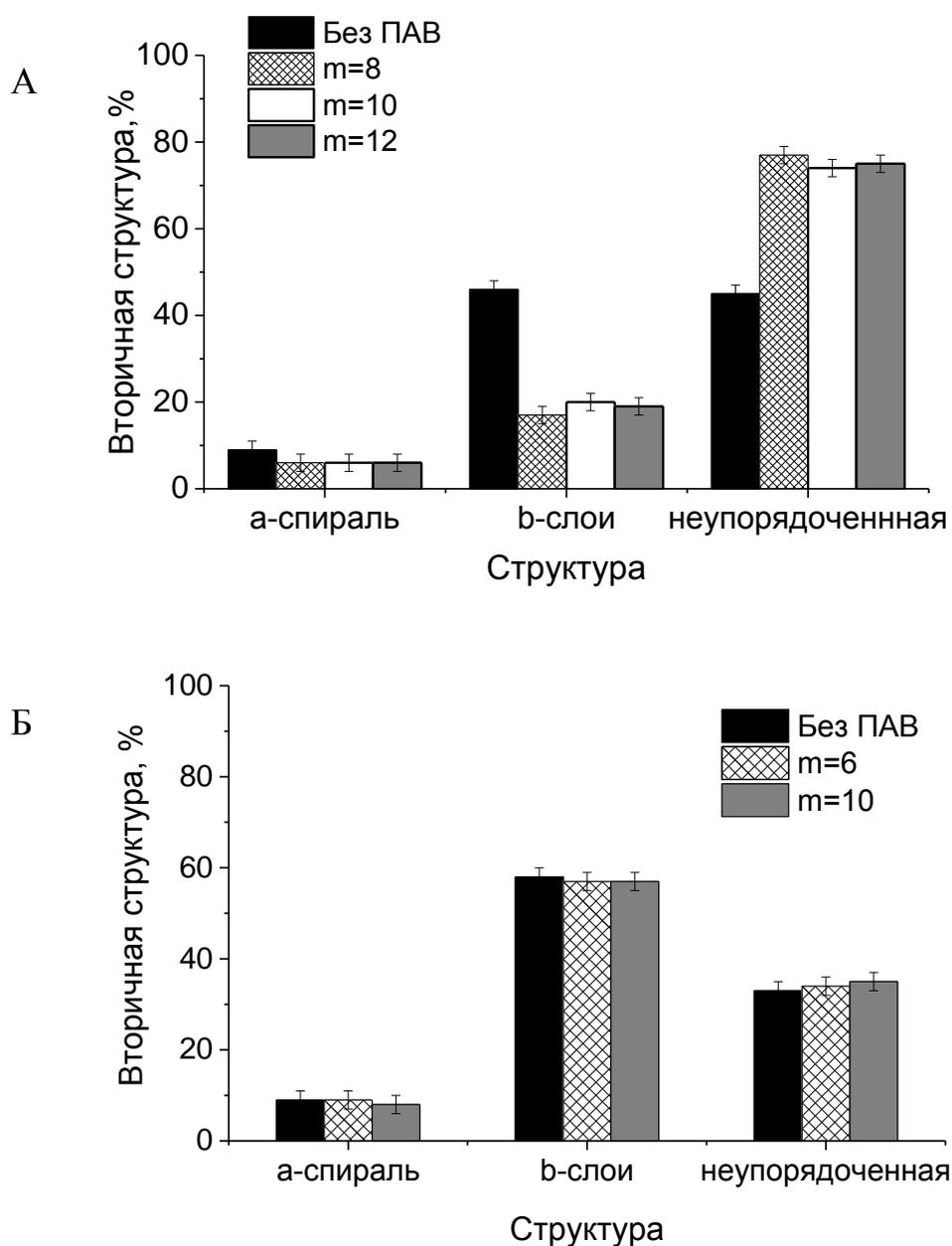


Рис. 59. Содержание компонент вторичной структуры α -химотрипсина (А) и трипсина (Б).

Таким образом, по результатам представленным в этом разделе можно заключить, что изменение эффективности катализа (k_{cat}/K_M) может быть вызвано изменением в структуре ферментов при взаимодействии с гидроксилсодержащими геминальными ПАВ с различной длиной спейсерного фрагмента. Нельзя также забывать о том, что значения ККМ исследованных гидроксилсодержащих геминальных ПАВ лежат в диапазоне 1.8 - 3.7 мкМ (Раздел 2.1.2., таблица 1), т.е. в условиях эксперимента все они находились в мицеллизованном состоянии, это может быть отражением возможных специфических взаимодействий (водородного связывания) между молекулами геминальных ПАВ, облегчающих процессы мицеллообразования. Водородное связывание может отражаться и на солюбилизации реагентов, а также регулировать скорость их взаимодействия. Доступность субстрата ферменту может уменьшаться в результате солюбилизации субстрата в мицеллах геминальных ПАВ.

В случае с α -химотрипсином, показано, что гидрофобный субстрат, каковым является БТНА, активно солюбилизируется в мицеллах геминальных ПАВ и коэффициент его распределения между водой и мицеллярным раствором резко уменьшается с ростом длины спейсера (таблица 2).

На рисунке 60 сопоставлены изменения начальной скорости реакции, катализируемой α -химотрипсином, с коэффициентом распределения БТНА между мицеллярной и водной фазами растворов ПАВ.

Если для систем геминальных ПАВ с $m=6$ и $m=8$ перераспределение субстрата между водной и мицеллярной фазами сопровождается понижением скорости реакции относительно ее уровня в буфере, то в системе геминального ПАВ с $m=12$ имеет место повышение скорости реакции относительно буфера.

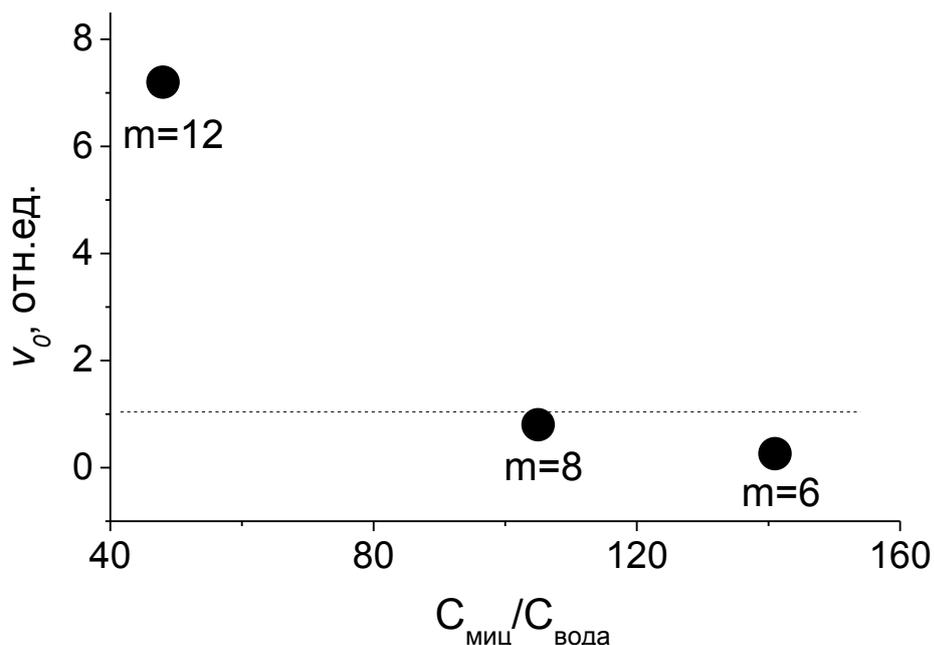


Рис. 60. Зависимость скорости гидролиза БТНА в системе α -химотрипсин/ГПАВ относительно буферного раствора от коэффициента распределения субстрата между мицеллярной и водной фазами ПАВ.

Из приведенной зависимости следует, что с уменьшением длины спейсера в ряду изученных гидроксилсодержащих ПАВ резко уменьшается концентрация субстрата в водной фазе системы, что, очевидно, является основным фактором, приводящим к уменьшению активности α -химотрипсина. Активность α -химотрипсина в присутствии гидроксилсодержащих геминальных ПАВ зависит от длины спейсерного фрагмента. Происходит рост активности при добавлении ГПАВ с большими спейсерными фрагментами, тогда как с остальными наблюдается уменьшение активности.

4.4. Анализ комплексообразования мономеров геминальных ПАВ с трипсином и α -химотрипсином методом молекулярного докинга

Метод молекулярного докинга был применен для исследования возможности образования комплекса белков с мономерами ПАВ. Программа Autodock позволила определить геометрию наиболее энергетически выгодных комплексов и рассчитать энергию взаимодействия макромолекул. Анализ был сделан для 50 наиболее энергетически выгодных комплексов.

Показано, что все исследованные геминальные ПАВ в мономерном состоянии образуют энергетически выгодные комплексы с молекулами ферментов, однако трипсин образует более устойчивые комплексы с мономерами ПАВ, чем α -химотрипсин (табл. 5). Меньшая энергия взаимодействия ПАВ с α -химотрипсином объясняется неблагоприятным электростатическим взаимодействием между положительно заряженным белком и геминальным ПАВ. Углеводородные радикалы геминальных ПАВ располагаются на поверхности белковой глобулы (рис. 61).

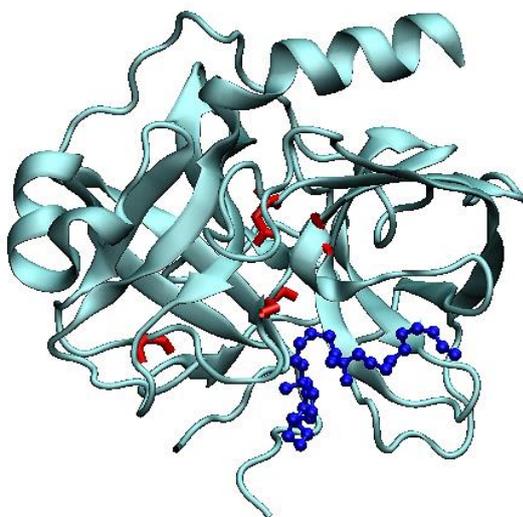


Рис. 61. Комплекс α -химотрипсина с ГПАВ (n=10) по данным молекулярного докинга.

Таблица 5. Энергия взаимодействия геминальных ПАВ с α -химотрипсином и трипсином

Тип комплекса	Средняя энергия Ккал/моль
химотрипсин-ГПАВ(n=16)	-8.4± 1.2
химотрипсин- ГПАВ(n=10)	-7.7± 1.1
химотрипсин-ГПАВ(m=6)	-4.6 ± 1.5
химотрипсин-ГПАВ(m=10)	-4.8 ± 1.5
трипсин- ГПАВ(n=16)	-10.4± 2.1
трипсин- ГПАВ(n=10)	-9.0± 1.8
трипсин-ГПАВ(m=6)	-9.6± 2.6
трипсин-ГПАВ(m=10)	-9.9± 3.1

Для α -химотрипсина характерно достаточно равномерное распределение молекул геминальных ПАВ по поверхности белка, включая контакты с аминокислотными остатками активного центра белка His57 и Ser195 (рис. 62). В случае трипсина, наблюдается более неравномерное распределение молекул ГПАВ по поверхности (рис. 63). В основном молекулы геминальных ПАВ локализуются в районе активного центра (рис. 61).

По-видимому, локализация мономерного ГПАВ на поверхности белка может приводить в некоторых случаях к понижению энергии активации реакции ферментативного катализа (возможно, за счет изменения структуры фермента или его интермедиатного состояния) и, как, следствие, увеличению константы скорости реакции и эффективности катализа.

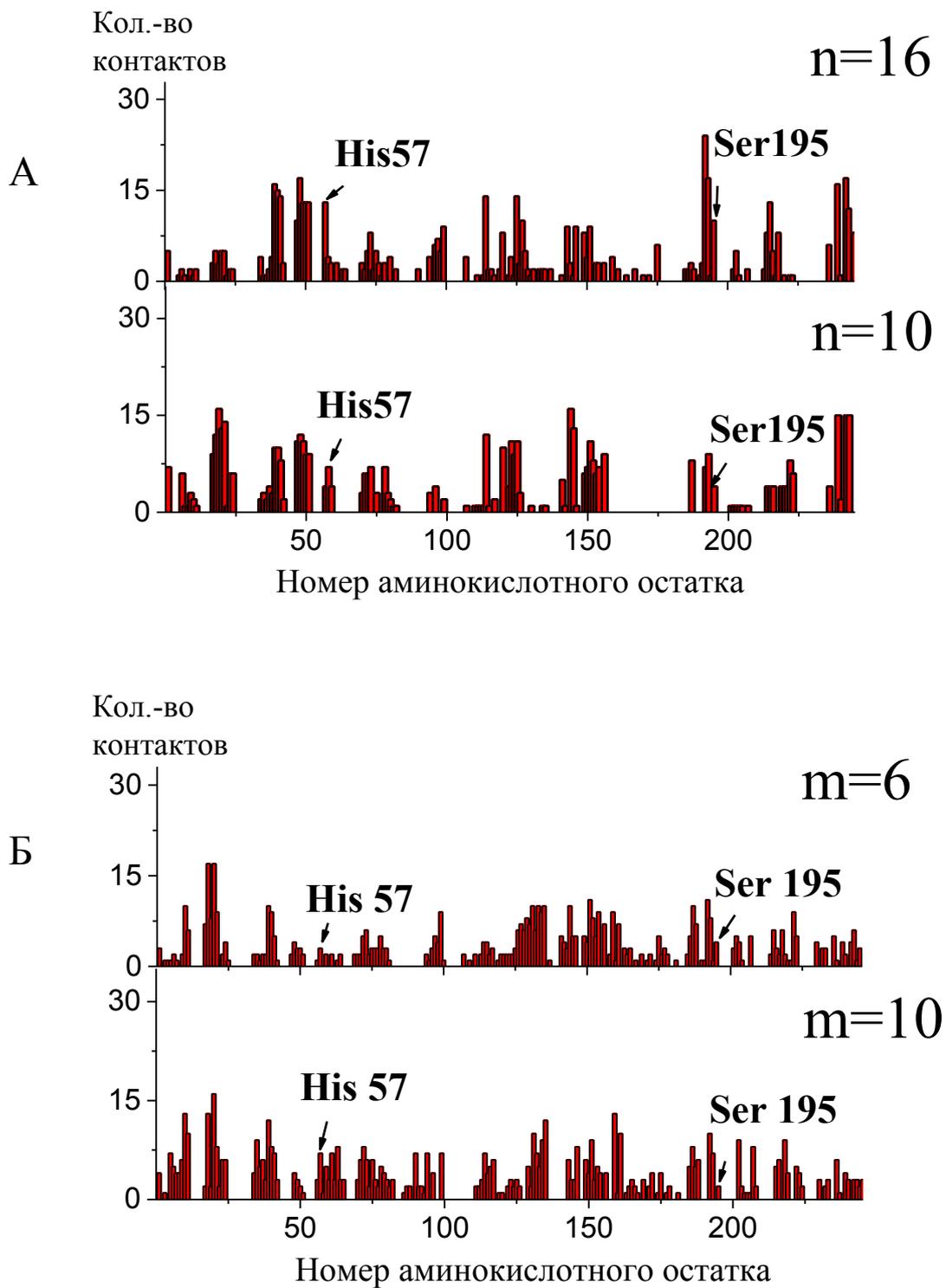


Рис. 62. Количество контактов образованных аминокислотными остатками α -химотрипсина с молекулами ГПАВ $n=10$, $n=16$ (А) и $m=6$, $m=10$ (Б).

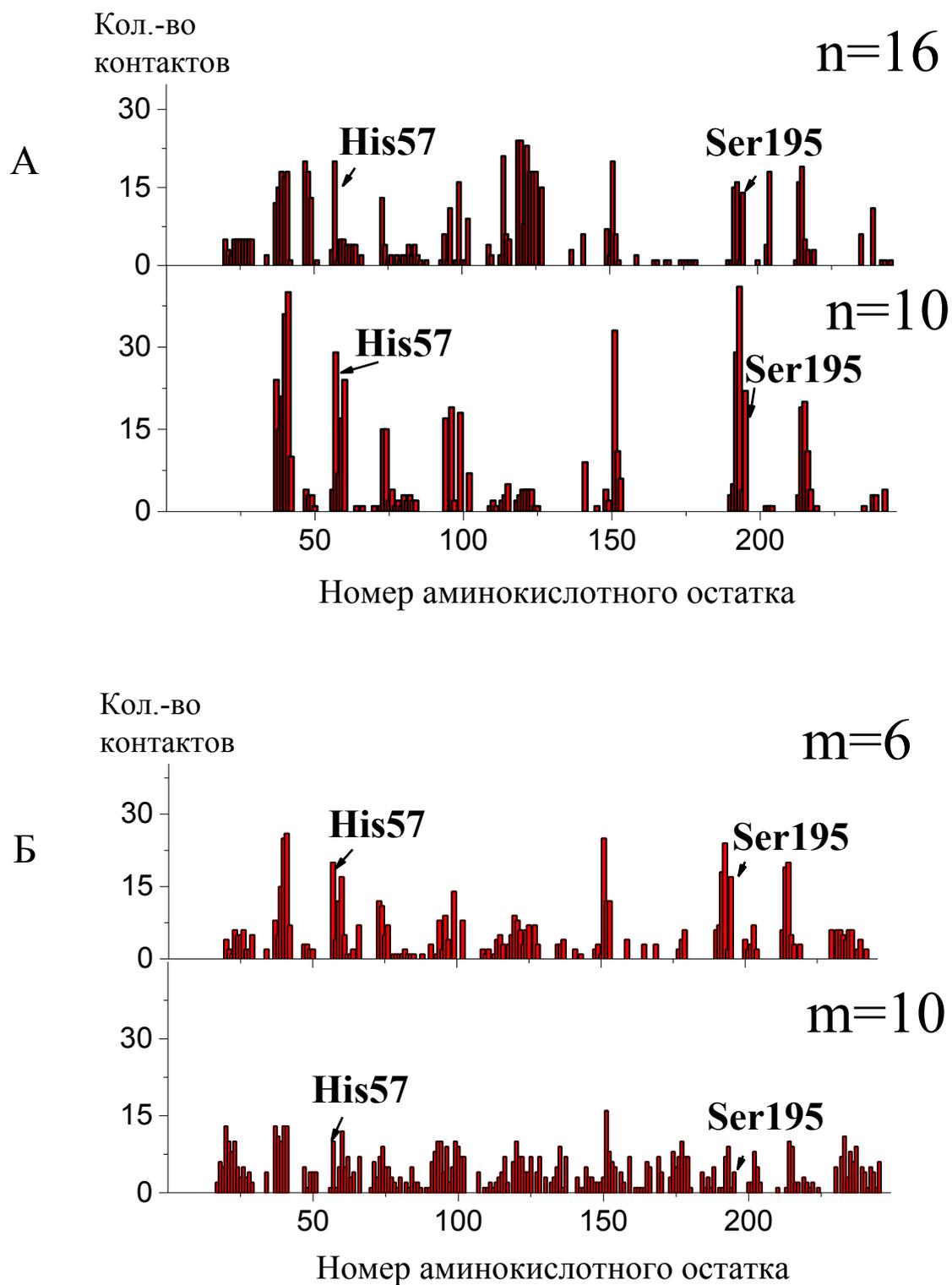


Рис. 63. Количество контактов образованных аминокислотными остатками трипсина с молекулами ГПАВ n=10 и n=16 (А) m=6 и m=10 (Б).

Таким образом, установлены существенные различия в поведении белков при взаимодействии с различными по структуре геминальными ПАВ. При взаимодействии α -химотрипсина с ГПАВ наблюдается изменение каталитической активности, имеющее противоположные векторы – в сторону ускорения или уменьшения. Геминальные ПАВ с метильными заместителями в головных группах в мономерной форме взаимодействуют с α -химотрипсином, тем самым усиливают его каталитическую активность. В мицеллярных растворах ПАВ происходит перераспределение субстрата между объемной и мицеллярной фазами раствора, что приводит к уменьшению количества субстрата в зоне реакции. Изменение длины спейсерного фрагмента в растворах гидроксилсодержащих геминальных ПАВ также вносит свою специфику в регуляцию каталитической активности α -химотрипсина. Активность фермента растет при добавлении ГПАВ со спейсерными фрагментами длиной $m > 10$, тогда как ГПАВ с более короткими спейсерами вызывают ее уменьшение. В отличие от α -химотрипсина, при взаимодействии трипсина со всеми видами ПАВ наблюдается уменьшение каталитической реакции. Важную роль в различии в поведении трипсина и α -химотрипсина вероятно играет строение самих ферментов (α -химотрипсин имеет большой положительный заряд), а также разница в сольбилизации субстратов растворами ГПАВ, которая во многом определяет доступность субстратов к активному центру ферментов.

Показано, что для исследованных в данной работе геминальных алкиламмонийных ПАВ изменение длины спейсерного фрагмента и длины алкильного радикала существенно меняет структуру супрамолекулярных комплексов ПАВ/белок и отражается на каталитической активности супрамолекулярной системы, что открывает широкие перспективы для понимания и дальнейшего использования регуляторного действия геминальных ПАВ.

ГЛАВА 5. МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ АМФИФИЛЬНЫМИ АЛКИЛОКСИБЕНЗОЛАМИ

Амфифильные низкомолекулярные соединения – алкилоксибензолы, будучи индукторами анабиоза бактерий, регулируют каталитическую активность различных ферментов (Tatzelt et al., 1996; Степаненко и др., 2004; Ross et al., 2004), поэтому их часто используют в качестве естественных структурных модификаторов ферментов. В наших исследованиях в качестве структурных модификаторов были использованы индивидуальные соединения АОБ – С7, С12, С18, различающиеся по длине алкильного радикала и как следствие по гидрофобности. Соединения АОБ С12 и С18 обладают более выраженными амфифильными свойствами, в то время как С7 по своей природе более гидрофилен, что предполагает различия в характере влияния на активность трипсина и α -химотрипсина.

5.1. Влияние амфифильных алкилоксибензолов на каталитическую активность и структуру трипсина и α -химотрипсина

Все попытки модифицировать каталитическую систему алкилоксибензолами приводили к снижению каталитической активности ферментов для всего ряда гомологов С7, С12 и С18. Уровень активности обоих ферментов в зависимости от условий эксперимента в присутствии С7 и С12 снижается до 50-90%, а в присутствии более гидрофобного С18 до 20-40% от контроля (табл. 6).

Таблица 6. Активность трипсина и α -химотрипсина в реакции гидролиза БАПНА и БТНА. Активность ферментов в буферном растворе принята за 100%

Фермент	АОБ	$C_{\text{АОБ}}$, мМ	Активность, %
трипсин	С7	0.5	90
		1	88.1
		2	59.5
	С12	0.5	80.1
		1	64.7
		2	63.5
	С18	0.02	46.5
		0.05	19.2
	химотрипсин	С7	0.5
1			61.2
2			55.4
С12		0.5	74.3
		1	76
		2	55.2
С18		0.02	53
		0.05	38.8

Следует также отметить, что в присутствии АОБ в системе АОБ/трипсин происходит смещение температурного максимума активности в сторону более высоких температур, по сравнению с контролем (рис. 64). Можно предположить, что все алкилоксибензолы С7, С12 и С18, в случае трипсина, обладают определенными термостабильными свойствами. В случае α -химотрипсина таких свойств не обнаружено (рис. 65). Способность АОБ изменять устойчивость ферментов к денатурирующему воздействию температуры подтверждается данными литературы (Николаев и др., 2008, Петровский и др., 2009).

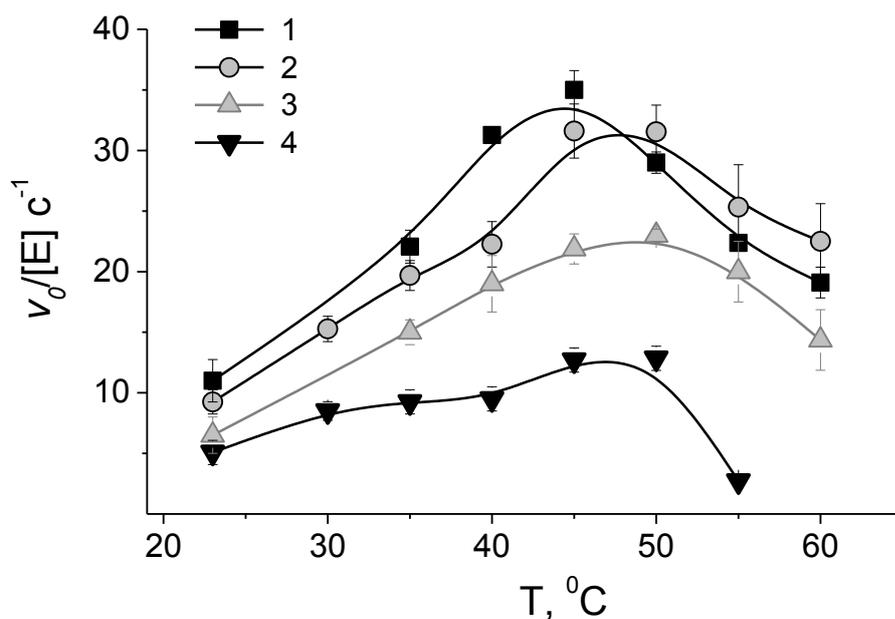


Рис. 64. Температурный профиль каталитической активности трипсина в присутствии АОБ: 1 – без АОБ, 2 – С7 (1мМ), 3 – С12 (1мМ), 4 – С18 (0.05мМ).

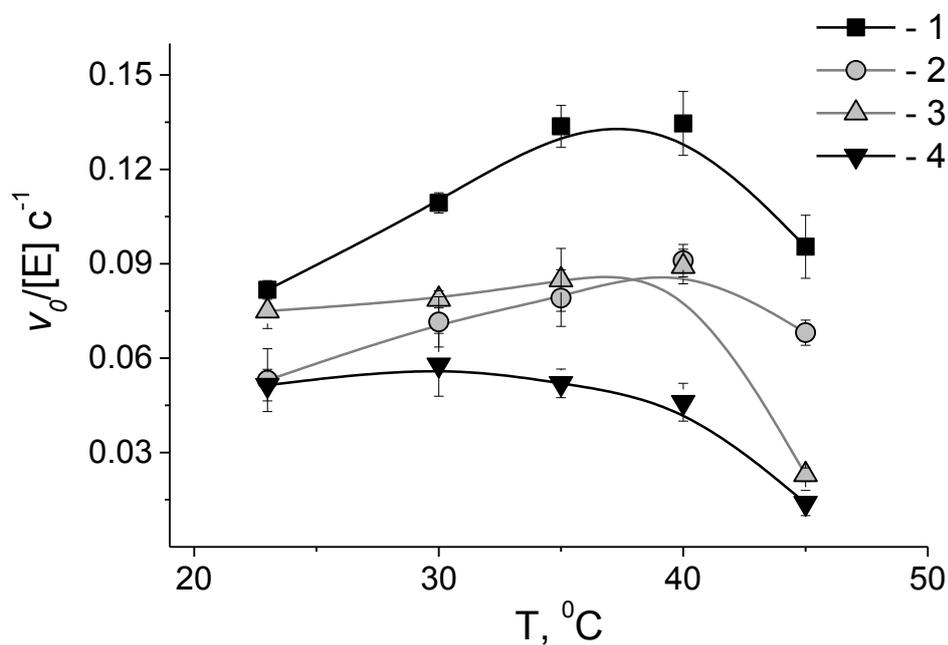


Рис. 65. Температурный профиль каталитической активности α -химотрипсина в присутствии АОБ: 1 – без АОБ, 2 – С7 (0.5мМ), 3 – С12 (0.5мМ), 4 – С18 (0.02мМ).

Для оценки влияния алкилоксибензолов на третичную структуру трипсина и α -химотрипсина были исследованы спектры внутренней (триптофановой) флуоресценции белков. Наблюдаемый сдвиг максимума флуоресценции в присутствии АОБ для трипсина и α -химотрипсина не превышал 2 нм по сравнению с контролем (табл. 6).

Детальный анализ флуоресценции белков затрудняется как обилием факторов, которые влияют на флуоресценцию, так и наличием в исследуемых белках нескольких разных видов триптофановых остатков. В состав молекул трипсина и α -химотрипсина входят 4 и 8 триптофановых остатков, соответственно. Длина волны максимума флуоресценции триптофана зависит от полярности окружения аминокислотного остатка. Для анализа изменений в структуре трипсина и α -химотрипсина, вызванных взаимодействием с молекулами алкилоксибензолов была использована модель дискретных состояний (Aboinev, Burstein, 1992; Burstein et al., 2001). Согласно этой модели в белках существуют максимум пять классов триптофановых остатков со строго определенными диапазонами длин волн максимума флуоресценции которые определяются свойствами их окружения в белке.

Используя алгоритм разложения спектров триптофановой флуоресценции белков (Burstein et. al, 2001), суммарные спектры трипсина и α -химотрипсина разложили на две лог-нормальные компоненты (табл. 7), что позволило выделить две компоненты с максимумами 330 нм и 340 нм. Пример такого разложения представлен на рисунке 6б.

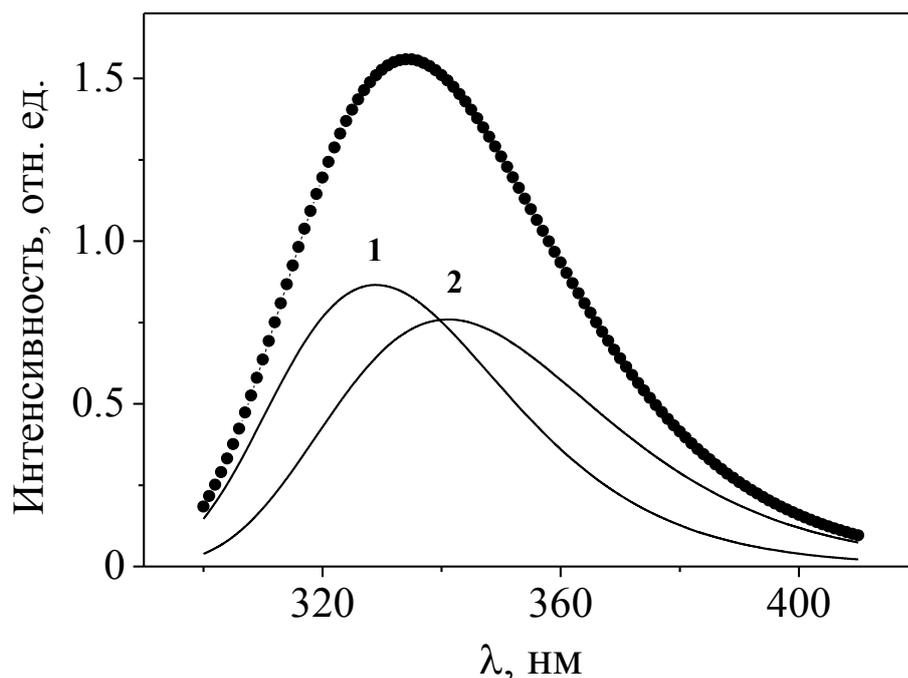


Рис. 66. Спектр флуоресценции α -химотрипсина и результат его разложения на лог-нормальные компоненты: 1 – коротковолновый компонент спектра (~ 330 нм); 2 – длинноволновой компонент спектра (~ 340).

Из четырех флуорофоров трипсина два частично доступны свободному растворителю – воде (Trp 215, 237), а два (Trp 51, 141) – практически недоступны. В α -химотрипсине по степени доступности растворителю на каждую группу приходится, соответственно, по четыре триптофановых остатка Trp 172, 207, 215, 237 и Trp 27, 29, 51, 141 (Решетняк, Бурштейн, 1997). У обоих белков излучение коротковолновых компонент спектра (~ 330 нм) с большой вероятностью определяют Trp141 и 51, а длинноволновых компонент (~ 340 нм) – главным образом Trp 215 и 237; в α -химотрипсине излучение остальных остатков в значительной степени тушится окружением.

Изменение положения максимума пика в области 330 нм, соответствующего флуоресценции Trp 51 и 141, практически недоступных воде, незначительно как для трипсина, так и для α -химотрипсина (табл. 7). Это свидетельствует об отсутствии «глубоких» нарушений структуры белков в области активного центра при контакте с АОБ (Trp 141 находится вблизи

активного центра). Несколько более существенные изменения претерпевает флуоресценция триптофанов, доступных растворителю в α -химотрипсине (табл. 7). Наблюдается достаточно сильный «голубой» сдвиг флуоресценции этих флуорофоров, что может свидетельствовать о частичной дегидратации поверхности белка за счет локализации АОБ на его поверхности.

Таблица 7. Положение максимумов суммарной флуоресценции (λ_{\max}) остатков триптофана трипсина и α -химотрипсина и положения максимумов компонент (λ_{\max}^{330} и λ_{\max}^{340}) в буфере и в растворах АОБ

Фермент	АОБ	λ_{\max} , нм	λ_{\max}^{330} , нм	λ_{\max}^{340} , нм
трипсин	контроль	332.45	328.6	340.1
	C7	332.55	327.9	339.3
	C12	335.03	330.3	340.7
	C18	332.85	327.8	340.1
химотрипсин	контроль	335.2	331.5	346.9
	C7	334.5	329.2	341
	C12	336.3	329.5	343
	C18	335.3	329.3	341.8

Можно предположить, что молекулы АОБ блокируют активный центр фермента и препятствуют процессу образования фермент-субстратного комплекса, что приводит к снижению скорости каталитического процесса. Снижение активности ферментов в присутствии АОБ в результате сольubilизации гидрофобного субстрата надмолекулярными агрегатами (мицеллами) амфифильными молекулами АОБ, что затрудняет доступ субстрата к ферменту, маловероятно, поскольку используемые концентрации АОБ находятся ниже их критической концентрации мицеллообразования (Пахомов и др., 2010, Мартиросова и др. 2014).

5.2. Анализ комплексообразования алкилоксибензолов с трипсином и α -химотрипсином методом молекулярного докинга

Для исследования возможности образования комплекса белков с мономерами алкилоксибензолов был применен метод молекулярного докинга. Программа Autodock позволила определить геометрию наиболее энергетически выгодных комплексов белок-лиганд и рассчитать энергию взаимодействия макромолекул. Были проанализированы следующие характеристики исследуемых систем: вероятность образования комплекса белков с молекулами АОБ (лиганд), энергия взаимодействия в наиболее энергетически выгодных комплексах (табл. 8 и рис. 67). Анализ был сделан для 50 наиболее энергетически выгодных комплексов.

Таблица 8. Энергия взаимодействия АОБ с трипсином и α -химотрипсином

Фермент	АОБ	Средняя энергия, ккал/моль
трипсин	C7	-8.1± 0.6
	C12	-8.9± 2.1
	C18	-8.3± 2.5
химотрипсин	C7	-6.1± 0.5
	C12	-6.8± 1.5
	C18	-6.8± 2.6

Анализ вероятности образования комплексов АОБ с различными аминокислотными остатками ферментов показал, что C7 (рис. 67) в основном локализован в субстрат-связывающем кармане, а C12 и C18 более равномерно распределены по поверхности белков, по-видимому, из-за их больших геометрических размеров.

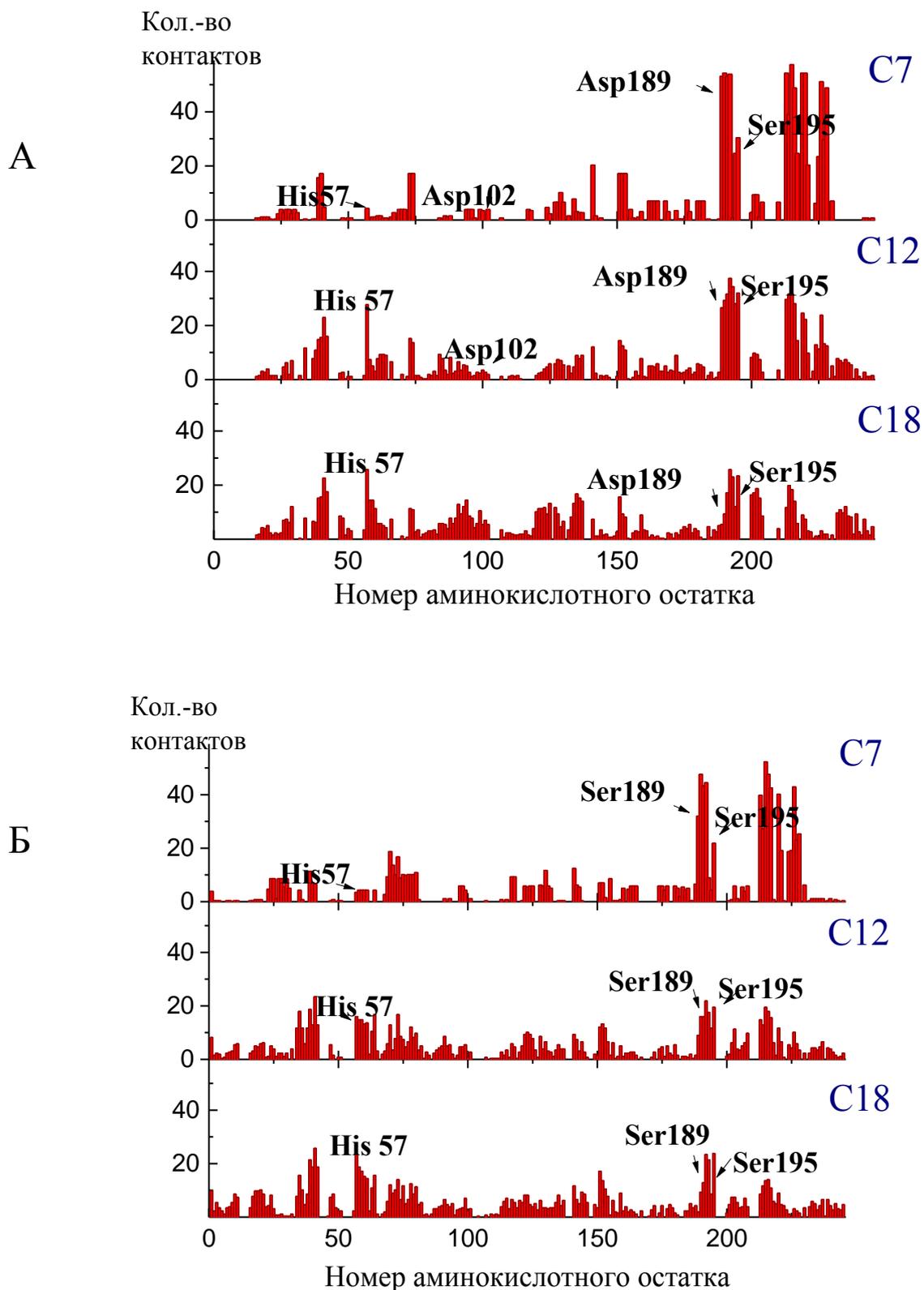


Рис. 67. Количество контактов образованных аминокислотными остатками трипсина (А) и α -химотрипсина (Б) с АОБ (His57, Asp102, Ser195 –

аминокислотные остатки активного центра; Asp189 – в субстрат-связывающем кармане трипсина, Ser189 – α -химотрипсина).

В то же время, энергия взаимодействия АОБ с трипсином выше, чем энергия взаимодействия с α -химотрипсином (табл. 8). Из результатов, приведенных на рисунке 67 следует, что для всех изученных АОБ наблюдается повышенная вероятность образования комплексов хотя бы с одним аминокислотным остатком, входящим в каталитическую триаду трипсина или α -химотрипсина.

Таким образом, наиболее вероятный механизм действия алкилоксибензолов на активность сериновых протеаз заключается в образовании устойчивых комплексов АОБ с ферментами, вследствие чего снижается каталитическая активность обоих ферментов. Однако, вследствие различий в локализации различных гомологов ряда АОБ на поверхности белка, изменения активности индивидуальны для каждого исследуемого соединения. Необходимо отметить, что ингибирование ферментативной реакции при добавлении АОБ не приводит к существенному нарушению белковой структуры под действием алкилоксибензолов, а определяется «блокировкой» доступа субстрата к активному центру фермента со стороны молекул АОБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование структуры и активности белков в комплексах с высоко- и низкомолекулярными лигандами является одним из пунктов Программы фундаментальных исследований государственных академий наук. Подобные комплексы интересны в фундаментальном и прикладном плане, в частности, при изучении молекулярных механизмов регуляции активности ферментов при взаимодействии с низкомолекулярными амфифильными соединениями. Аналогичные комплексы также являются структурными интермедиатами при работе различных сигнальных систем. Амфифильные соединения, в молекулах которых пространственно разнесены полярные и неполярные участки, специфически взаимодействуют с поверхностью белковых макромолекул.

В данной работе проведено комплексное исследование влияния ряда амфифильных соединений, отличающихся по структуре, строению и заряду головных групп на активность классических представителей сериновых протеаз - трипсина и α -химотрипсина. Результаты использования триптофановой флуоресценции и ИК-спектроскопии позволили оценить структурные изменения, происходящие с белком в растворах ПАВ. Данные по солюбилизационной емкости мицеллярных растворов, а также результаты ЯМР-самодиффузии компонент исследуемых систем свидетельствуют о микрогетерогенности реакционных сред с наличием соответствующих механизмов регуляции активности ферментов. Результаты молекулярного докинга показали, что существует специфика связывания различных амфифильных соединений с белковыми макромолекулами. Таким образом, установлено, что амфифильные соединения оказывают влияние на структуру фермента и на всю реакционную среду в целом, включая условия фермент-субстратного взаимодействия. Предложена следующая модель функционирования сериновых протеаз в растворах амфифильных соединений (рис. 68).

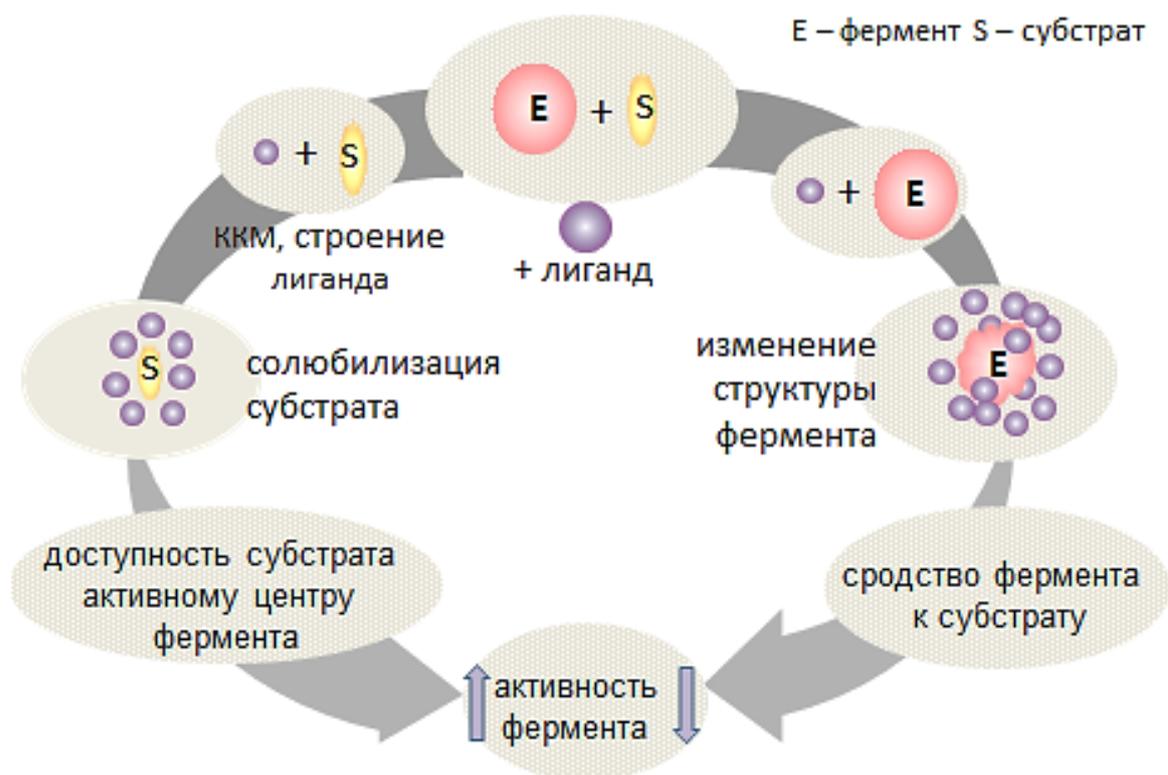


Рис. 68. Модель функционирования трипсина и α-химотрипсина в растворах амфифильных соединений.

Изменение активности трипсина и α-химотрипсина в растворах амфифильных соединений с одной стороны контролируется изменением доступности субстрата к активному центру фермента вследствие различий в солюбилизации субстрата мицеллами в зависимости от строения и концентрации ПАВ, а с другой стороны изменением сродства фермента к субстрату при изменении структуры фермента.

Полученные в работе результаты расширяют современные представления о роли комплексов белок-лиганд в модуляции структуры и функциональной активности белков.

ВЫВОДЫ

1. На примере сериновых протеаз предложена схема использования взаимодополняющих методов ферментативной кинетики, ЯМР, динамического светорассеяния, флуоресценции, ИК-спектроскопии и молекулярного докинга для исследования регуляторного действия амфифильных соединений на активность ферментов.
2. Установлено, что изменение каталитической активности сериновых протеаз в микроэмульсионной среде связано с модификацией структуры ферментов и свойств реакционной среды нормальными алифатическими спиртами (уменьшением размеров мицеллярных агрегатов, усилением влияния зарядов поверхности раздела фаз).
3. При взаимодействии трипсина и α -химотрипсина с геминальными катионными алкиламмонийными поверхностно-активными соединениями впервые установлены факторы, определяющие специфичность их действия на каталитическую активность ферментов. Специфичность определяется: различием в локализации лиганда на поверхности фермента, индуцирующего различные изменения в его структуре, изменением солюбилизационной емкости растворов различных ПАВ по отношению к субстратам и их доступность для ферментативного действия.
4. Впервые показано, что выбор строения и концентрации катионных геминальных поверхностно-активных соединений позволяет регулировать активность сериновых протеаз как в сторону уменьшения, так и существенного увеличения скорости ферментативной реакции.
5. Впервые показано, что алкилоксибензолы уменьшают каталитическую активность трипсина и α -химотрипсина, блокируя доступ субстрата к активному центру фермента. Для всех изученных алкилоксибензолов наблюдается высокая вероятность образования комплексов с участием хотя бы одного аминокислотного остатка, входящего в каталитическую триаду сериновых протеаз. Высказано предположение, что одним из механизмов

действия алкилоксибензолов, как индукторов анабиоза, является обратимая блокировка активного центра ферментов.

б. Предложена модель регуляции активности сериновых протеаз в растворах амфифильных соединений, основанная на изменении микроокружения фермента и субстрата и доступности субстрата активному центру фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аблакова, Ю.Р. Системы на основе неионных амфифильных соединений: агрегация и каталитические свойства / Ю.Р. Аблакова, А.Б. Миргородская, Л.Я. Захарова, Ф.Г. Валеева // Известия АН. сер. хим.. – 2010. – Т. 4. – С. 768–773.
2. Антонов, В.К. Химия протеолиза / В.К. Антонов. - М.: Наука, 1991. – 504 с.
3. Белова А.Б. Взаимосвязь физико-химических характеристик органических растворителей с их денатурирующей способностью по отношению к белкам / А.Б. Белова, В.В. Можаяев, А.В. Левашов, М.В. Сергеева, К. Мартинек, Ю.А. Хмельницкий // Биохимия. – 1991. – Т. 56. – С. 1923–1945.
4. Беляева, Е.А. К вопросу о механизме взаимодействия органического растворителя с активным центром α -химотрипсина / Е.А. Беляева, Д.В. Гра, Н.Л. Еремеев // Биохимия. – 2002. – Т. 67. – С. 1246–1251.
5. Березин И.В. Действие ферментов в обращенных мицеллах. 39-е Баховское чтение / И.В. Березин. – Москва: Наука, 1985. – 40 с.
6. Бреслер, С.Е. Исследование ферментативно-активных осколков трипсина / С.Е. Бреслер, М. Шампань, С.Я. Френкель // Биохимия. – 1961. – Т. 26. – С. 909–915.
7. Варфоломеев, С.Д. Активные центры гидролаз: основные типы структур и механизм катализа / С.Д. Варфоломеев, А.Е. Пожитков // Вестник Моск. Ун.-та. сер. 2. Химия. – 2000. - Т.41. - № 3. – С. 147–156.
8. Вылегжанина, Н.Н. Динамическая структура мицелл геминальных алкиламмонийных ПАВ / Н.Н. Вылегжанина, А.Б. Миргородская, В.А. Панкратов, Ю.Ф. Зуев // Коллоидный журнал. – 2010. – Т. 72. – С. 162–170.

9. Гладиллин, А.К. Стабильность ферментов в системах с органическими растворителями / А.К. Гладиллин, А.В. Левашов // Биохимия. – 1998. – Т. 63. – С. 408–421.
10. Гороновский, И.Т. Краткий справочник по химии / И.Т. Гороновский, Ю.П. Назаренко, Е.Ф. Некряч. – под ред. А.Т. Пилипенко. – Киев: Наукова думка. 1987. – 833 с.
11. Доброгорская, Я.И. Моделирование реакции ацилирования субстрата в активном центре сериновых протеаз / Я.И. Доброгорская, А.В. Немухин // Вестн. Моск. ун.-та: сер. 2. химия. – 2003. – Т. 44. - №2. – С. 103–107.
12. Захарова, Л.Я. Влияние электролитов на каталитические свойства и структурные характеристики мицелл бромида додецилпиридиния / Л.Я. Захарова, Д.Б. Кудрявцев, Л.А. Кудрявцева, Ю.Ф. Зуев, Н.Л. Захарченко, Н.Н. Вылегжанина, З.Ш. Идиятуллин, В.Д. Федотов // Журнал общей химии. – 2002. – Т. 72. – № 3. – С. 458–464.
13. Ильинская, О.Н. Роль бактериальных ауторегуляторов роста группы алкилоксибензолов в ответе стафилококков на стрессовые воздействия / О.Н. Ильинская, А.И. Колпаков, М.А. Шмидт, Е.В. Дорошенко, А.Л. Мулюкин, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2002. – Т. 71. – С. 23–29.
14. Клесов, А.А. Природа субстратной специфичности трипсина. Роль заряда и гидрофобности боковой цепи в определении реакционной способности специфических субстратов / А.А. Клесов // Биоорганическая химия. – 1977. – Т. 3. - №8. – С. 1100–1110.
15. Клячко Н.Л. Замена воды на водно-органическую смесь в системах обращенных мицелл – путь к повышению эффективности ферментативного катализа / Н.Л. Клячко, Н.Г. Богданова, К. Мартинек, А.В. Левашов // Биоорганическая химия. – 1990. – Т. 16. – С. 581–589.
16. Клячко, Н.Л. Катализ ферментами в агрегатах поверхностно-активных веществ: оптимальная конструкция матрицы ПАВ / Н.Л. Клячко, А.В.

- Пшежетский, А.В. Кабанов, С.В. Вакула, К. Мартинек, А.В. Левашов // Биологические мембраны. – 1990. – Т. 7. – С. 467–472.
17. Колпаков, А.И. Стабилизация ферментов аутоиндукторами анабиоза как один из механизмов устойчивости покоящихся форм микроорганизмов / А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская, М.М. Беспалов, Ф.Г. Куприянова-Ашина, В.Ф. Гальченко, Б.И. Курганов, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2000. – Т. 69. – № 2. – С. 224–230.
18. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рё. - М.: Мир, 2009. – 469 с.
19. Корниш-Боуден, Э. Основы ферментативной кинетики / Э. Корниш-Боуден – Пер. с англ. / под. ред. Б. И. Курганова – М.: Мир, 1979. – 280 с.
20. Котрикадзе, Н.Г. Регуляция каталитических свойств фермента в «обращенных мицеллах» / Н.Г. Котрикадзе, Б.А. Ломсадзе, М.А. Царидзе, О.С. Джишкариани, А.В. Левашов // Биофизика. – 1999. – Т. 44. – С. 231–235.
21. Кудряшова, Е.В. Белки в надмолекулярных ансамблях: исследование структуры методом разрешенно-временной флуоресцентной анизотропии / Е.В. Кудряшова, А.К. Гладилин, А.В. Левашов // Успехи биологической химии. – 2002. – Т. 42. – С. 257–294.
22. Ланге, К.Р. Поверхностно-активные вещества. Синтез, свойства, анализ, применение / К.Р. Ланге. – Санкт-Петербург: Профессия, 2005. – 240 с.
23. Левашов, А.В. Катализ водорастворимыми ферментами, включенными в обращенные мицеллы поверхностно-активного вещества в неводных растворителях / А.В. Левашов, Н.Л. Клячко, В.И. Пантин, Ю.Л. Хмельницкий, К. Мартинек // Биоорганическая химия. – 1980. – Т. 6. – С. 929–942.
24. Левашов, А.В. Мицеллярная энзимология: методы и техника / А.В. Левашов, Н.Л. Клячко // Известия АН. сер. хим.. – 2001. – №10. – С. 1638–1651.

25. Мартинек К. Гидрофобное взаимодействие алифатических спиртов с активным центром α -химотрипсина / К. Мартинек, А.В. Левашов, И.В. Березин // Молекулярная биология. – 1970. – Т. 4. – С. 517–527.
26. Мартиросова, Е.И. Модификация ферментов естественными химическими шаперонами микроорганизмов / Е.И. Мартиросова, Т.А. Карпекина, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2004. – Т. 73. – С. 708–715.
27. Мартиросова, Е.И. Регулирование функциональных свойств лизоцима путем взаимодействия с 5-метилрезорцином / Е.И. Мартиросова, И.Г. Плащина, Н.Г. Лойко, М.А. Краснова, Г.И. Эль-Регистан // Химическая физика биологических процессов. – 2014. – Т. 33. - №. 8. – С. 43–48.
28. Миргородская, А.Б. Алкиламмонийные геминальные поверхностно-активные вещества: агрегационные свойства и каталитическая активность / А.Б. Миргородская, Л.А. Кудрявцева, В.А. Панкратов, С.С. Лукашенко, Л.З. Ризванова, А.И. Коновалов // Журнал общей химии. – 2006. – Т. 76. – № 10. – С. 1696–1702.
29. Миргородская, А.Б. Смешанные мицеллярные системы геминальных алкиламмонийных ПАВ и длинноцепных аминов / А.Б. Миргородская, Л.А. Кудрявцева, Н.Н. Вылегжанина, Б.З. Идиятуллин, Ю.Ф. Зуев // Известия АН, Сер. хим.. – 2010. – Т. 59. – С. 774–780.
30. Миттел, К. Мицеллообразование, солюбилизация и микроэмульсии / К. Миттел. – М.: Мир, 1980. – 598 с.
31. Нарижнева, Н.В. Понижение диэлектрической проницаемости среды трансформирует белковую молекулу в состояние расплавленной глобулы / Н.В. Нарижнева, В.Н. Уверский // Биохимия. – 1998. – Т.63. – N.4. – С. 532–540.
32. Николаев, Ю.А. Изменения физико-химических свойств белков, модифицированных алкилоксибензолами / Ю.А. Николаев, Н.Г. Лойко, И.Ю. Степаненко, Е.Ф. Шаненко, Е.И. Мартиросова, В.К. Плакунов, А.Н. Козлова, И.А. Борзенков, О.А. Коротина, Д.С. Родин, Ю.Ф.

- Крупянский, Г.И. Эль-Регистан // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44. – С.159–167.
33. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А. Овчинников. – М.: Просвещение, 1987. – 816 с.
34. Пахомов, Ю.Д. Роль некультивируемых форм неспорообразующих бактерий в поддержании гомеостаза популяции / Ю.Д. Пахомов, Л.П. Блинкова, Л.Г. Стоянова // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. - №4. – Р. 57–66.
35. Петровский, А.С. Регуляция алкилоксибензолами функциональной активности лизоцима / А.С. Петровский, Д.Г. Дерябин, Н.Г. Лойко, Н.А. Михайленко, Т.Г. Кобзева, П.А. Канаев, Ю.А. Николаев, Ю.Ф. Крупянский, А.Н. Козлова, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2009. – Т. 78. – С.176–185.
36. Поглазов, Б.Ф. Организация биохимических систем / Б.Ф. Поглазов // Биохимия. – 1996. – Т. 61. – С. 1941–1947.
37. Решетняк, Я.К. Отнесение компонент спектра флуоресценции сериновых протеаз к кластерам остатков триптофана / Я.К. Решетняк, Э.А. Бурштейн // Биофизика. – 1997. – Т. 42. – С.785–795.
38. Родионова, М.В. О механизмах денатурации ферментов органическими растворителями / М.В. Родионова, Ф.Б. Белова, В.В. Можаяев, К. Мартинек, И.В. Березин // ДАН СССР. - 1987. - Т.292. – N.4. - С. 913.
39. Русанов, А.И. Мицеллообразование в растворах поверхностно-активных веществ / А.И. Русанов. – СПб.: Химия, 1992. – 280 с.
40. Саввин, С.Б. Поверхностноактивные вещества / С.Б. Саввин, Р.К. Чернова, С.Н. Штыков. – Москва: Наука, 1991. – 250 с.
41. Симаненко, Ю.С. Функциональные детергенты, содержащие иммидазолиевое ядро и типичные фрагменты α -нуклеофилов – основа высокоэффективных мицеллярных систем для расщепления эфиров кислот фосфора / Ю.С. Симаненко, Е.А. Карпичев, Т.М. Прокопьева,

- А.Ф. Попов, В.А. Савелова, И.А. Белоусова, А. Латт // Журнал органической химии. – 2004. – Т. 40. – № 2. – С. 234–246.
42. Степаненко, И.Ю. Защита *Saccharomyces cerevisiae* алкилоксибензолами от окислительного и радиационного поражения / И.Ю. Степаненко, М.Г. Страховская, Н.С. Беленикина, Ю.А. Николаев, А.Л. Мулюкин, А.Н. Козлова, А.А. Ревина, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2004. – Т. 73. – С. 204–210.
43. Степаненко, И.Ю. Роль алкилоксибензолов в адаптации *Microsoccus luteus* к температурному шоку / И.Ю. Степаненко, А.Л. Мулюкин, А.Н. Козлова, Ю.А. Николаев, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2005. – Т. 74. – С. 26–33.
44. Халгаш, Я. Биокатализаторы в органическом синтезе / Я. Халгаш. - М.: Мир, 1991. – 204 с.
45. Хмельницкий, Ю.Л. Кинетическая теория ферментативных реакций в системах обращенных мицелл поверхностно-активных веществ в органических растворителях: применение псевдофазного подхода для случая субстратов, способных распределяться между всеми фазами мицеллярной системы / Ю.Л. Хмельницкий, И.Н. Неверова, В.И. Поляков, В.Я. Гринберг, А.В. Левашов, К. Мартинек // Биоорганическая химия. – 1989. – Т. 15. – С. 1602–1610.
46. Abornev, S.M. Decomposition fluorescence spectra of tryptophan residues in proteins based on log-normal components by a least squares method / S.M. Abornev, E.A. Burshtein // Mol Biol (Mosk). – 1992. – V. 26. – P. 1350–1361.
47. Abuin, E. Kinetics of 2-naphthyl acetate hydrolysis catalyzed by γ -chymotrypsin in aqueous solutions of dodecyltrimethylammonium bromide / E. Abuin, E. Lissi, R. Duarte // Langmuir. – 2003. – V. 19. – P. 5374–5377.
48. Acharya, D.P. Progress in microemulsion characterization / D.P. Acharya, P.G. Hartley // Curr. Opin. Colloid Interface Sci.. – 2012. – V. 17. – P. 274 – 280.

49. Ahammed, S.N. A review on microemulsions / S.N. Ahammed, S. Srinivasan, K. Kavitha, M.R. Kumar, P.S. Kumar // *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. – 2013. – V. 5. – I. 2. – P. 10–14.
50. Alexander, M. Dynamic light scattering techniques and their applications in food science / M. Alexander, D.G. Dalgleish // *Food Biophysics*. – 2006. – V.1. – P. 2–13.
51. Alfani, F. α -Chymotrypsin superactivity in cetyltrialkylammonium bromide-rich media / F. Alfani, M. Cantarella, N. Spreti, R. Germani, G. Savelli // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2000. – V. 88. – P. 1–15.
52. Andersson, A.A.M. Effects of environment and variety on alkylresorcinols in wheat in the HEALTHGRAIN diversity screen / A.A.M. Andersson, A. Kamal-Eldin, P. Aman // *J. Agric. Food Chem.*. – 2010. – V. 58. – P. 9299–9306.
53. Aswal, V.K. Micellar structures of dimeric surfactants with phosphate head groups and wettable spacers: a small-angle neutron scattering study / V.K. Aswal, S. De, P.S. Goyal, S. Bhattacharya, R.K. Heenan // *Physical Review E*. – 1999. – V. 59. – P. 3116–3122.
54. Bachovchin, W.W. Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy. The state of histidine in the catalytic triad of α -lytic protease. Implications for the charge-relay mechanism of peptide-bond cleavage by serine proteases / W.W. Bachovchin, J. D. Roberts // *Journal of the American Chemical Society*. – 1978. – V. 100. – P. 8041–8047.
55. Bahar, I. Intrinsic dynamics of enzymes in the unbound state and relation to allosteric regulation / I. Bahar, C. Chennubhotla, D. Tobi // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2007. – V. 17. – P. 633–640.
56. Bai, G. Thermodynamics of interaction between cationic gemini surfactants and hydrophobically modified polymers in aqueous solutions / G. Bai, Y. Wang, H. Yan, R.K. Thomas, J.C.T. Kwak // *J. Physical Chemistry B*. – 2002. – V. 106. – P. 2153–2159.

57. Barrett, A.J. Classification of peptidases / Barrett A.J. // *Methods in Enzymology*. – 1994. – V. 244. – P. 1–18.
58. Barth, A. The infrared absorption of amino acid side chains / A. Barth // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 2000. – V. 74. – P. 141–173.
59. Bernstein, F.S. The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures / F.S. Bernstein, T.F. Koetzle, G.J. Williams, E.F.Jr. Meyer, M.D. Brice, J.R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi // *Journal of Molecular Biology*. – 1977. – V. 112. – P. 535–542.
60. Bhattacharya, S Understanding membranes through the molecular design of lipids / S. Bhattacharya, J. Biswas // *Langmuir*. – 2010. – V. 26. – P. 4642–4654.
61. Blow, D.M. X-ray diffraction studies of enzymes / D.M. Blow, T.A. Steits // *Annual Review of Biochemistry*. – 1970. – V. 39. – P. 63 – 100.
62. Borse, M.S. Importance of head group polarity in controlling aggregation properties of cationic gemini surfactants / M.S. Borse, S. Devi // *Adv. colloid and interface sci.* – 2006. – V. 123 – 126. – P. 387–399.
63. Branden, C. Introduction to protein structure / C. Branden, J. Tooze. – N.Y.: Garland Publ., 1991. – 320 p.
64. Bühling, F. Proteases and their role in chronic inflammatory lung diseases / F. Bühling, D. Groneberg, T. Welte // *Current Drug Targets*. – 2006. – V. 7. - № 6. – P. 751–759.
65. Bunton, C.A. Organic reactivity in aqueous micelles and similar assemblies / C.A. Bunton, G. Savelli // *Adv. Phys. Chem.* – 1986. – V. 22. – P. 213–309.
66. Burstein, E.A. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. I. Decomposition algorithms / E.A. Burstein, S.M. Abornev, Y.K. Reshetnyak // *Biophysical Journal*. – 2001. – V. 81. – P. 1699–1709.

67. Castro, G.R. Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures / G.R. Castro, T. Knubovets / *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2003. – V. 23. – P. 195–231.
68. Celej, M.S. Superactivity and conformational changes on alpha-chymotrypsin upon interfacial binding to cationic micelles / M.S. Celej, M.G. D'Andrea, P.T. Campana, G.D. Fidelio, M.L. Bianconi // *Biochemical Journal*. – 2004. – V. 378. – P. 1059–1066.
69. Chang, G.-G. Reverse micelles as life-mimicking systems / G.-G. Chang, T.-M. Huang, H.-C. Hung // *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B*. – 2000. – V. 24. – P. 89–100.
70. Chen, L. Effect of the spacer group of cationic gemini surfactant on microemulsion phase behavior / L. Chen, Y. Shang, H. Liu, Y. Hu // *Journal of colloid and interface science*. – 2006. – V. 301. – P. 644–650.
71. Colomer A. Cationic surfactants derived from lysine: effects of their structure and charge type on antimicrobial and hemolytic activities / A. Colomer, A. Pinazo, M.A. Manresa, M.P. Vinardell, M. Mitjans, M.R. Infante, and L. Perez // *J. Med. Chem*. – 2011. – V. 54. – P. 989–1002.
72. Couderc, S. Catalysis of phosphate triester hydrolysis by micelles of hexadecyltrimethylammonium anti-pyruvaldehyde 1-oximate / S. Couderc, J. Toullec // *Langmuir*. – 2001. – V. 17. – P. 3819–3828.
73. Das, K. Probing enzyme location in water-in-oil microemulsion using enzyme-carbon dot conjugates / K. Das, S. Maiti, P.K. Das // *Langmuir*. – 2014. – V. 30. – P. 2448–2459.
74. Di Michele, A. Effect of head group size, temperature and counterion specificity on cationic micelles / A. Di Michele, L. Brinchi, P. Di Profio, R. Germania, G. Savellia, G. Onori // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2011. – V. 358. – P. 160–166.
75. Domingos, J.B. Reaction of bis(2,4-dinitrophenyl) phosphate with hydrazine and hydrogen peroxide. Comparing O- and N- phosphorylation / J.B. Domingos, E. Longhinotti, T.A.S. Brandao, C.A. Bunton, L.S. Santos, M.N.

- Eberlin, F. Nome // *Journal of Organic Chemistry*. – 2004. – V. 69. – P. 7898–7905.
76. El-Registan, G.I. The role of microbial low-molecular-weight autoregulatory factors (alkylhydroxybenzenes) in resistance of microorganisms to radiation and heat shock / G.I. El-Registan, A.L. Mulyukin, Yu.A. Nikolaev, I.Yu. Stepanenko, A.N. Kozlova, E.I. Martirosova, E.F. Shanenko, M.G. Strakhovskaya, A.A. Revina // *Advances in Space Research*. – 2005. – V.36. – P. 1718–1728.
77. El-Seoud, O.A. Acid-base indicator equilibria in aerosol-OT reversed micelles in heptane. The use of buffers / O.A. El-Seoud, A.M. Chinelatto // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 1983. – V. 95. – P. 163–171.
78. Engbersen, J.F.J. Effects of crown ethers and small amounts of cosolvent on the activity and enantioselectivity of α -chymotrypsin in organic solvents / J.F.J. Engbersen, J. Broos, W. Verboom, D.N. Reinhoudt // *Pure and Applied Chemistry*. – 1994. – V. 68. – P. 2171–2178.
79. Fadnavis, N.W. Reactivity of trypsin in reverse micelles: pH-effects on the W_0 versus enzyme activity profiles / N.W. Fadnavis, R.L. Babu, A. Deshpande // *Biochimie*. – 1998. – V. 80. – P. 1025–1030.
80. Faustino, C.M.C. Gemini Surfactant–Protein Interactions: Effect of pH, Temperature, and Surfactant Stereochemistry / C.M.C. Faustino, A.R.T. Calado, L. Garcia-Rio // *Biomacromolecules*. – 2009. – V. 10. – P. 2508–2514.
81. Fedotov, V.D. Self-Diffusion in microemulsion and micellar size / V.D. Fedotov, Yu. F. Zuev, V.P. Archipov, Z.Sh. Idiyatullin // *Applied Magnetic Resonance*. – 1996. – V. 11. – P. 7–17.
82. Fendler, E.J. Micellar catalysis in organic reactions: kinetic and mechanistic applications / E.J. Fendler, J.H. Fendler // *Advances in Physical Organic Chemistry*. – 1970. – V. 8. – P. 271–406.
83. Fendler, J.H. Atomic and molecular clusters in membrane mimetic chemistry / J.H. Fendler // *Chemical Reviews*. – 1987. – V. 87. – № 3. – P. 877–899.

84. Flanagan, J. Microemulsions: a potential delivery system for bioactives in food / J. Flanagan, H. Singh // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2006. – V. 46. – P. 221–237.
85. Flores, G.O. Characteristics of adenyllyl imidodiphosphate- and ADP-binding sites insoluble and particulate mitochondrial ATPase. Studies with methanol / G.O. Flores, A. Acosta, A.G. Puyou // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1982. – V. 679. – P. 466–473.
86. Freeman, M. Rhomboid proteases and their biological functions / M. Freeman // *Annual Review of Genetics*. – 2008. – V. 42. – P. 191–210.
87. Friberg, S.E. Microemulsions: structure and dynamics / S.E. Friberg, P. Bothorel. – CRC Press: Boca Raton, 1987. – 79 p.
88. Gangnard, S., Modifications of the charges at the N-terminus of bovine β -casein: Consequences on its structure and its micellisation / S. Gangnard, Yu. Zuev, J.-C. Gaudin, V. Fedotov, Y. Choiset, M.A.V. Axelos, J.-M. Chobert, Th. Haertle // *Food Hydrocolloids*. – 2007. – V. 21. – P. 180–190.
89. Ghosh, K.K. Effect of cationic gemini surfactants on the hydrolysis of carboxylate and phosphate esters using hydroxamate ions / K.K. Ghosh, S. Kolay, S. Bal, M.L. Satnami, P. Quagliotto, P.R. Dafonte // *Colloid and Polymer Science*. – 2008. – V. 286. – P. 293–303.
90. Ghosh, S. A multitechnique approach in protein/surfactant interaction study: physicochemical aspects of sodium dodecyl sulfate in the presence of trypsin in aqueous medium / S. Ghosh, A. Banerjee // *Biomacromolecules*. – 2002. – V. 3. – P. 9–16.
91. Ghosh, S. Interaction of bovine serum albumin with N-acyl amino acid based anionic surfactants: Effect of head-group hydrophobicity / S. Ghosh, J. Dey // *Colloid Interface Sci.* – 2015. – V. 458. P. 284–292.
92. Gull, N. Interaction of bovine (BSA), rabbit (RSA), and porcine (PSA) serum albumins with cationic single-chain/gemini surfactants: a comparative study / N. Gull, P. Sen, R.H. Khan, Kabir-ud-Din // *Langmuir*. – 2009. – V. 25. – P. 11686–11691.

93. Gupta, M.N. Enzymes in organic media / M. N. Gupta, I. Roy // *European Journal of Biochemistry*. – 2004. – V. 271. – P. 2575–2583.
94. Han, X. Degradation of the pesticide fenitrothion as mediated by cationic surfactants and α -nucleophilic reagents / X. Han, V.K. Balakrishnan, G. W. van Loon, E. Buncl // *Langmuir*. – 2006. – V. 22. – P. 9009–9017.
95. Han, Y. Facile disassembly of amyloid fibrils using gemini surfactant micelles / Y. Han, Ch. He, M. Cao, X. Huang, Y. Wang, Z. Li // *Langmuir*. – 2010. – V. 26. – P. 1583–1587.
96. He, Sh. Preparation and antimicrobial properties of gemini surfactant-supported triiodide complex system / Sh. He, B. Wang, H. Chen, C. Tang, Y. Feng // *Appl. Mater. Interfaces*. – 2012. – V.4. – P. 2116–2123.
97. Hedstrom, L. Serine protease mechanism and specificity / L. Hedstrom // *Chemical Reviews*. – 2002. – V. 102. – P. 4501–4523.
98. Hladyszowsk, J. Quantum mechanical and experimental oxidation studies of pentadecylresorcinol, olivetol, orcinol and resorcinol / J. Hladyszowski, L. Zubik, A. Kozubek // *Free radical research*. – 1997. – V. 28. – P. 359–368.
99. Honda, C. Studies on bovine serum albumin–sodium dodecyl sulfate complexes using pyrene fluorescence probe and 5-doxydstearic acid spin probe / C. Honda, H. Kamizono, K. Matsumoto, K. Endo // *Journal of colloid and interface science*. – 2004. – V. 278. – P. 310–317.
100. Horwitz, A.M. Leukemia in severe congenital neutropenia: defective proteolysis suggests new pathways to malignancy and opportunities for therapy / A.M. Horwitz, F.Q. Li, D. Albani, Z. Duan, R.E. Person, K. Meade-White, K.F. Benson // *J. Cancer Investigation*. – 2003. – V. 21. - № 4. – P. 579–587.
101. Ji, X. Temperature-induced aggregate transitions in mixtures of cationic ammonium gemini surfactant with anionic glutamic acid surfactant in aqueous solution / X. Ji, M. Tian, Y. Wang // *Langmuir*. – 2016. – V. 32. P. 972–981.

102. Joshi J.V. Role of counterion of the surfactant molecule on the micellar structure in aqueous solution / J.V. Joshi, V.K. Aswal, P. Bahadur, P.S. Goyal // *Current Science*. – 2002. – V. 83. – P.47–49.
103. Joye, I.J. Nanotechnology for increased micronutrient bioavailability / I.J. Joye, G. Davidov-Pardo, D.J. McClements // *Trends in food science & technology*. – 2014. – P. 1–15.
104. Jumpertz, T. High-throughput evaluation of the critical micelle concentration of detergents / T. Jumpertz, B. Tschapek, N. Infed, S.H. Smits, R. Ernst, L. Schmitt // *Analytical Biochemistry*. – 2011. – V. 408. – P. 64–70.
105. Kabir-ud-Din Catalytic role of gemini surfactant micelles in the ninhydrin–L-isoleucine reaction / Kabir-ud-Din, U.S. Siddiqui // *Colloid Journal*. – 2010. – V. 72. - №.1. – P. 14–22.
106. Kedar, U. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting / U. Kedar, P. Phutane, S. Shidhaye, V. Kadam // *Nanomedicine*. – 2010. – V. 6. – P. 714–729.
107. Kelley, D. Interactions of bovine serum albumin with ionic surfactants in aqueous solutions / D. Kelley, D. J. McClements // *Food Hydrocolloids*. – 2003. – Vol. 17. – P. 73–85.
108. Khmelnitsky Y.L. Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis / Y. L. Khmelnitsky, V.V. Mozhaev, A.B. Belova, M.V. Sergeeva, K. Martinek // *European Journal of Biochemistry*. – 1991. – V. 198. – P. 31–41.
109. Khmelnitsky, Y.L. Salts dramatically enhance activity of enzymes suspended in organic solvents / Y.L. Khmelnitsky, S.H. Welch, D.S. Clark, J.S. Dordick // *Journal of the American Chemical Society*. – 1994. – V. 116 (6). – P. 2647–2648.
110. Kijima, T. Fluorescence spectroscopic study of subtilisins as relevant to their catalytic activity in aqueous-organic media // T. Kijima, S. Yamamoto, H. Kise // *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. – 1994. – V.67. – P.2819–2824.

111. Klibanov, A.M. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents / A.M. Klibanov // *Trends in Biochemical Sciences*- 1989. – V.14. – P. 141–144.
112. Klibanov, A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents / A.M. Klibanov // *Nature*. – 2001. – V. 409. – P. 241–246.
113. Klyachko, N.L. Bioorganic synthesis in reverse micelles and related systems / N.L. Klyachko, A.V. Levashov // *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. – 2003. – V.8. – P.179–186.
114. Kong, X.-N. LPS-induced down-regulation of signal regulatory protein α contributes to innate immune activation in macrophages / X.-N. Kong, H.-X. Yan, L. Chen, L.-W. Dong, W. Yang, Q. Liu, L.-X. Yu, D.-Dan Huang, Sh.-Q. Liu, H. Liu, M.-Ch. Wu, H.-Y. Wang // *Journal of Experimental Medicine*. – 2007. – V. 204. - № 11. – P. 2719–2731.
115. Kozubek, A. Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity / A. Kozubek, J.H.P. Tyman // *Chemical reviews*. – 1999. – V. 99. – P. 1–25.
116. Kudryashova, E.V. Enzyme-polyelectrolyte complexes in water-ethanol mixtures: Negatively charged groups artificially introduced into α -chymotrypsin provide additional activation and stabilization effects / E.V. Kudryashova, A.K. Gladilin, A.V. Vakurov, F. Heitz, A.V. Levashov, V.V. Mozhaev // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1997. – V. 55. – P. 267–277.
117. Kumar, S. Effect of polymethylene spacer of cationic gemini surfactants on solvation dynamics and rotational relaxation of coumarin 153 in aqueous micelles / S. Kumar, S. Kumari, S.K. Saha // *J. Phys. Chem. B*. – 2015. – DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b03081.
118. Kumar, V.P. Computational study on hydroxybenzotriazoles as reagents for ester hydrolysis // V.P. Kumar, B. Ganguly, S. Bhattacharya // *Journal of Organic Chemistry*. – 2004. – V. 69. – P. 8634–8642.
119. Kunishima, M. Substrate-selective dehydrocondensation at the interface of micelles and emulsions of common surfactants / M. Kunishima, K. Kikuchi,

- Y. Kawai, K. Hioki // *Angew.Chem.. Int. Ed.* – 2012. – V. 51. – P. 2080–2083.
120. Lakowicz, J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy* / J.R. Lakowicz. – Springer US, 1999. – P. 697.
121. Landberg, R. Dose response of whole-grain biomarkers: alkylresorcinols in human plasma and their metabolites in urine in relation to intake / R. Landberg, P. Aman, L.E. Friberg, B. Vessby, H. Adlercreutz, A. Kamal-Eldin // *American journal of clinical nutrition.* – 2009. – V. 89. – P. 290–296.
122. Lawrence, M.J. *Microemulsion-based media as novel drug delivery systems* / M.J. Lawrence, G.D. Rees // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2000. – V. 45. – P. 89–121.
123. Levashov, A.V. Enzymes entrapped into reversed micelles in organic solvents: Sedimentation analysis of the protein—aerosol OT-H₂O-Octane system / A.V. Levashov, Yu.L. Khmel'nitsky, N.L. Klyachko, V.Ya. Chernyak, K. Martinek // *Journal of Colloid and Interface Science.* – 1982. – V. 88. – P. 444–457.
124. Levashov, A.V. *Micellar enzymology: methods and technique* / A.V. Levashov, N.L. Klyachko // *Russian Chemical Bulletin (Engl. Ed.).* – 2001. – V. 50. – P. 1718–1732.
125. Li, Y.J. Comparative studies on interactions of bovineserum albumin with cationic gemini and single-chain surfactant / Y.J. Li, X.Y. Wang, Y.L. Wang // *J. Physical Chemistry B.* – 2006. – V. 110. – P. 8499–8505.
126. Lu, Zh. Alcohols enhance caerulein-induced zymogen activation in pancreatic acinar cells / Zh. Lu, S. Karne, T. Kolodecik, F.S. Gorelick // *American Journal of Physiology: Gastrointest. Liver Physiol.* – 2002. – V. 282. – P. 501–507.
127. Luisi, P.L. *Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules* / P.L. Luisi, M. Giomini, M.P. Pileni, B.H. Robinson // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1988. – V. 947. – P. 209–246.

128. Lyubarev, A.E. Organization of Biochemical Systems: Structural and regulatory aspects / A.E. Lyubarev, B.I. Kurganov // N.Y.: Nova Science. - 1996. - P. 2–60.
129. Martinek, K Micellar enzymology: its relation to membranology / K. Martinek, N. L. Klyachko, A. V. Kabanov et al. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1989. – V. 981. – P.161–172.
130. McClellan, S.J. Exclusion of bovine serum albumin from the air/water interface by sodium myristate / S.J. McClellan, E.I. Franses // *Colloids Surf.. B*. – 2003. – V. 30. – P. 1–11.
131. Menger, F.M. Gemini Surfactants / F.M. Mener, J.S. Keiper // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2000. – V. 39. – P. 1906–1920.
132. Mir, M.A. Interaction of bovine serum albumin with cationic single chain+nonionic and cationic gemini+nonionic binary surfactant mixtures / M.A. Mir, N. Gull, J.M. Khan, R.H. Khan, A.A. Dar, G.M. Rather // *J. Physical Chemistry B*. – 2010. – V. 114. – P. 3197–3204.
133. Mondal, S. Interaction of myoglobin with cationic and nonionic surfactant in phosphate buffer media / S. Mondal, M.L. Raposo, G. Prieto, S. Ghosh // *J. Chem. Eng..* – 2016. – DOI: 10.1021/acs.jced.5b00858.
134. Mondal, S. Interaction of myoglobin with cationic gemini surfactants in phosphate buffer at pH 7.4 / S. Mondal, S. Das, S.J. Ghosh // *Surfactants Deterg.* – 2015. – V. 18. – P. 471–476.
135. Morris, G.M. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility / G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson // *Journal of Computational Chemistry*. – 2009. – V. 30. – P. 2785–2791.
136. Moulik, S.P. On the versatile surfactant aerosol-OT (AOT): its physicochemical and surface chemical behaviours and uses / Moulik S.P., Mukherjee K. // *Proceedings-indian national science academy part A*. – 1996. – V. 62. – P. 215–236.

137. Mozhaev, V.V. Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/cosolvent mixtures. α -Chymotrypsin and laccase in mixed water/alcohol, water/glycol and water/formamide solvents. / V.V. Mozhaev, Yu.L. Khmel'nitsky, M.V. Sergeeva, A.B. Belova, N.L. Klyachko, A.V. Levashov, K. Martinek // *European Journal of Biochemistry*. – 1989. – V.184. – P. 597–602.
138. Mukherjee, K. Thermodynamics of micellization of aerosol OT in polar and nonpolar solvents. a calorimetric study / K. Mukherjee, S.P. Moulik, D.C. Mukherjee // *Langmuir*. – 1993. – V. 9. – P. 1727–1730.
139. Muzaffar, F. Review on microemulsion as futuristic drug delivery // F. Muzaffar, U.K. Singh, L. Chauhan // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*. – 2013. – V. 5. – I. 3. – P. 39–53.
140. Nakahara, H. Solubilization of n-alkylbenzenes into gemini surfactant micelles in aqueous medium / H. Nakahara, Y. Kojima, Y. Moroi, O. Shibata // *Langmuir*. – 2014. – V. 30(20). – P. 577–5779.
141. Oldham, M.L. Structural insights into ABC transporter mechanism / M.L. Oldham, A.L. Davidson, J. Chen // *Curr. Opin. Struct. Biol.*. – 2008. – V. 18. – P. 726–733.
142. Omakor, J.E. Mechanisms of abiotic degradation and soil–water interactions of pesticides and other hydrophobic organic compounds. Part 3. Nucleophilic displacement at the phosphorus centre of the pesticide fenitrothion [O,O-dimethyl O-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate] by oxygen nucleophiles in aqueous solution: α -effect and mechanism/ J. E. Omakor, O. Ikenna, G. W. van Loon, E. Buncl // *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2*. – 2001. – V. 1. – P. 324–330.
143. Otzen, D. Protein–surfactant interactions: A tale of many states / Otzen Daniel // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2011. – V. 1814. – P. 562–591.
144. Papikka, K. In vitro antioxidant activity and antigenotoxicity of 5-n-alkylresorcinols / K. Parikka, I.R. Rowland, R.W. Welch, K. Wahala // *J. Agric. Food Chem.*. – 2006. – V. 54. – P. 1646–1650.

145. Paul, B.K. Microemulsions: an overview / B.K. Paul, S.P. Moulik, J. Dispersion // *Sci. Technol.*. – 1997. – V. 18. – P. 301–367.
146. Pi, Y.Y. Interactions between bovine and gemini surfactant alkanediyl- α,ω -bis (dimethyldodecyl-ammonium bromide) / Y.Y. Pi, Y.Z. Shang, C.J. Peng, H.L. Liu, Y. Hu, J.W. Jiang // *Biopolymers*. – 2006. – V. 83. – P. 243–249.
147. Piotto, M. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions / M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenar // *J. Biomol. NMR*. – 1992. – V. 2. – P. 661–665.
148. Rangel-Yagui, C.O. Micellar solubilization of drugs / C.O. Rangel-Yagui, A. Pessoa-Jr, L.C. Tavares // *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*. – 2005. – V. 8. – P. 147–163.
149. Reis, S. Noninvasive methods to determine the critical micelle concentration of some bile acid salts / S. Reis, C.G. Moutinho, C. Matos B. de Castro, P. Gameiro, J. L.F.C. Lima // *Anal. Biochem.*. – 2004. – V. 334. – P. 117–126.
150. Reshetnyak, Y.K. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. II. The statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins / Y.K. Reshetnyak, E.A. Burstein // *Biophys. J.*. – 2001. – V. 81. – P. 1710–1734.
151. Romsted, L.S. Micellar effects on reaction rates and equilibria / L.S. Romsted // *Surfactants in Solution*; Ed. K. L. Mittal. – New-York-London: Plenum Press, 1984. – V. 4. – P. 1015–1068.
152. Rosen, M.J. Surfactants and interfacial phenomena / M.J. Rosen. – New Jersey: John Wiley & Sons, 1989. – 444 p.
153. Ross, A.B. Dietary alkylresorcinols: absorption, bioactivities, and possible use as biomarkers of whole-grain wheat- and rye-rich foods / A.B. Ross, A. Kamal-Eldin, P. Åman // *Nutrition Reviews*. – 2004. – V. 62. - №3. – P. 81–95.
154. Rottman, C. Getting a library of activities from a single compound: tunability and very large shifts in acidity constants induced by sol-gel entrapped

- micelles / C. Rottman, D. Avnir // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – V. 123. – P.5730–5734.
155. Roy, S. Water dynamics in gyroid phases of self-assembled gemini surfactants / S. Roy, D. Skoff, D.V. Perroni, J. Mondal, A. Yethiraj, M.K. Mahanthappa, M.T. Zanni, J.L. Skinner // *J. Am. Chem. Soc.* – 2015. – DOI: 10.1021/jacs.5b12370.
156. Salvesen, G.S. Caspase mechanisms / G.S. Salvesen, S.J. Riedl // *Adv. Exp. Med. Biol.* - 2008. - V. 615. - P. 13–23.
157. Santos, S.F. A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering / S.F. Santos, D. Zanette, H. Fischer, R. Itri // *Journal of colloid and interface science.* – 2003. – V. 262. – P. 400–408.
158. Sarkhejiya, N.A. Emerging trend of microemulsion in formulation and research / N.A. Sarkhejiya, M.A. Nakum, V.P. Patel, S. A. Atara, T.R. Desai // *Int. Bull. Drug Res.* – 2013. – V. 1. – P. 54–83.
159. Sekhon, B.S. Gemini (dimeric) surfactants / B.S. Sekhon // *Resonance.* – 2004. – P. 42–49.
160. Sharma, V. Synthesis, characterization, and SANS studies of novel alkanediyl- α,ω -bis(hydroxyethylmethylhexadecylammonium bromide) cationic gemini surfactants / V. Sharma, M. Borse, V.K. Aswal, N.K. Pokhriyal, J.V. Joshi, P.S. Goyal, S. Devi // *J. Coll. Interface Sci.* – 2004. – V. 277. – P. 450–455.
161. Shrestha, R.G. Peptide-Based Gemini Amphiphiles: Phase Behavior and Rheology of Wormlike Micelles / R.G. Shrestha, K. Nomura, M. Yamamoto, Y. Yamawaki, Y. Tamura, K. Sakai, K. Sakamoto, H. Sakai, M. Abe // *Langmuir.* – 2012. V. 28. – P. 15472–15481.
162. Simon L.M., Structure and activity of α -chymotrypsin and trypsin in aqueous organic media / L.M. Simon, M. Kotormán, G. Garab, I. Laszkó // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – V. 280. – P. 1367–1371.

163. Singer, S.J. The properties of proteins in nonaqueous solvents. / S.J. Singer // *Adv. Prot. Chem.*. – 1962. – V.17. – P. 1–68.
164. Spornath, A. Microemulsions as carriers for drugs and nutraceuticals / A. Spornath, A. Aserin // *Advances in colloid and interface science.* – 2006. – V. 128. P. 47–64.
165. Stamatis, H. Bioorganic reactions in microemulsions: the case of lipases / H. Stamatis, A. Xenakis, F.N. Kolisis // *Biotechnology Advances.* – 1999. – V. 17. – P. 293–318.
166. Stanley, F.E. Rapid determination of surfactant critical micelle concentrations using pressure-driven flow with capillary electrophoresis instrumentation / F. E. Stanley, A. M. Warner, E. Schneiderman, A. M. Stalcup // *J. Chromatogr. A.* – 2009. – V. 1216. – P. 8431–8434.
167. Starov, V. Why do aqueous surfactant solutions spread over hydrophobic substrates? / V. Starov, N. Ivanova, R.G. Rubio // *Adv. Colloid Interface Sci.*. – 2010. – V. 161. – P. 153–162.
168. Strejskal, E.O. Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient / E.O. Strejskal, J.E. Tanner // *J. Chem. Phys.* – 1965. – V. 42. – P. 288–293.
169. Stupishina, E.A. Catalytic activity, structure and stability of trypsin in an AOT-stabilised water-in-decane microemulsion / E.A. Stupishina, D.A. Faizullin, N.L. Zakhartchenko, V.D. Fedotov, Yu. F. Zuev // *Mendeleev Commun.*. – 2001. – T. 6. – P. 237–240.
170. Tadros, T.F. *Surfactants* / T.F. Tadros. – Academic Press, 1984. – 342 p.
171. Tai, S. Spectroscopic studies on the interactions of bovine serum albumin with alkyl sulfate gemini surfactants / S. Tai, X. Liu, W. Chen, Z. Gao, F. Niu // *Colloids and surfaces A: physicochem. Eng. aspects.* – 2014. – V. 441. – P. 532–538.
172. Tatzelt, J. Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein / J. Tatzelt, S.B. Prusiner, W.J. Welch // *EMBO J.*. – 1996. – V.15. – P. 6363–6373.

173. Terrier, F. Revisiting the reactivity of oximate-nucleophiles with electrophilic phosphorus centers. Relevance to detoxification of sarin, soman and DFP under mild conditions // F. Terrier, P. Rodriguez-Dafonte, E. Le Guevel, G. Moutiers // *Org. Biomol. Chem.*. – 2006. – V. 4. – P. 4352–4363.
174. Tomiuchi, Y. Fluorescence spectroscopic study of α -chymotrypsin as relevant to catalytic activity in aqueous-organic media. / Y. Tomiuchi, T. Kijima, H. Kise // *Bull. Chem. Soc. Jap.*. – 1993. – V. 66. – P. 1176–1181.
175. Tonova, K. Reversed micelle solvents as tools of enzyme purification and enzyme-catalyzed conversion / K. Tonova, Z. Lazarova // *Biotech. Adv.*. – 2008. – V. 26. – P. 516–532.
176. Valstar, A. The interaction of bovine serum albumin with surfactants studied by light scattering / A. Valstar, M. Almgren, W. Brown // *Langmuir*. – 2000. – V. 16. – P. 922–927.
177. Villa, C. Green synthesis, molecular characterization and associative behavior of some gemini surfactants without a spacer group / C. Villa, S. Baldassari, D.F.C. Martino, A. Spinella, E. Caponetti // *Materials*. – 2013. – V. 6. – P. 1506–1519.
178. Viparelli, P. Experimental validation of a model for α -chymotrypsin activity in aqueous solutions of surfactant aggregates / P. Viparelli, F. Alfani, M. Cantarella // *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*. – 2001. – V. 15. – P. 1–8.
179. Wang, R. Effects of cationic ammonium gemini surfactant on micellization of peo-ppo-peo triblock copolymers in aqueous solution / R. Wang, Y. Tang, Y. Wang // *Langmuir*. – 2014. – V. 30. – P. 1957–1968.
180. Wang, Y. Comparative studies of interactions of hemoglobin with single-chain and with gemini surfactants / Y. Wang, R. Guo, J. Xi // *Journal of colloid and interface science*. – 2009. – V. 331. – P. 470–475.
181. Wang, Y. Synthesis and binding with BSA of a new gemini surfactant / Y. Wang, X. Jiang, L. Zhou, L. Yang, G. Xia, Z. Chen, M. Duan // *Colloids Surf. A*. – 2013. – V. 436. – P. 1159–1169.

182. Wangsakan, A. Effect of surfactant type on surfactant-maltodextrin interactions: isothermal titration calorimetry, surface tensiometry, and ultrasonic velocimetry study / A. Wangsakan, P. Chinachoti, D. J. McClements // *Langmuir*. – 2004. – V. 20. – P. 3913–3919.
183. Wei, H. Thermo-sensitive polymeric micelles based on poly(N-isopropylacrylamide) as drug carriers / H. Wei, S.-X. Cheng, X.-Z. Zhang, R.-X. Zhuo // *Prog. Polym. Sci.*. – 2009. – V. 34. – P. 893–910.
184. Wu, D. Interaction between Proteins and Cationic Gemini Surfactant / D. Wu, G. Xu, Yu. Sun, H. Zhang, H. Mao, Yu. Feng // *Biomacromolecules*. – 2007. – V. 8. – P. 708–712.
185. Zaheer, Z. Sub- and post-micellar catalytic and inhibitory effects of cetyltrimethylammonium bromide in the permanganate oxidation of phenylalanine / Z. Zaheer, Raiuddin // *Colloids Surf.. B*. – 2009. – V. 69. – P. 251–256.
186. Zakharova, L. Supramolecular systems based on mono- and dicationic pyrimidinic amphiphiles: self-organization and complexation with oligonucleotides / L. Zakharova, M. Voronin, D. Gabdrakhmanov, V. Semenov, R. Giniyatullin, V. Syakaev, Sh. Latypov, V. Reznik, A. Konovalov, Y. Zuev // *Chem.Phys.Chem.*. – 2012. – V.13. – P. 788–796.
187. Zaks, A. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents / A. Zaks, A.M. Klibanov // *Proc. Natl. Acad. Sci.*. – 1988. – V. 82. – P. 3192–3196.
188. Zana, R. Dimeric (gemini) surfactants: effect of the spacer group on the association behavior in aqueous solution / R. Zana // *J. Colloid Interface Sci.*. – 2002. – V. 248. – P. 203–220.
189. Zana, R. Dimeric and oligomeric surfactants. Behavior at interfaces and in aqueous solution: a review / R. Zana // *Adv. Colloid and Interface Sci.*. – 2002. – V. 97. – P. 205–253.
190. Zdziennicka, A. Critical micelle concentration of some surfactants and thermodynamic parameters of their micellization / A. Zdziennicka, K.

- Szymczyk, J. Krawczyk, B. Janczuk // *Fluid Phase Equilib.* – 2012. – V. 322–323. – P. 126–134.
191. Zuev Yu.F. Structural properties of microheterogeneous surfactant-based catalytic systems: multicomponent self-diffusion NMR Approach / Yu.F. Zuev, A.B. Mirgorodskaya, B.Z. Idiyatullin // *Appl. Magn. Reson.* – 2004. – V. 27. – P. 489–500.