

На правах рукописи

Валиуллина Юлия Анатольевна

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

03.01.02 - биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2016

Работа выполнена в лаборатории биофизической химии наносистем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук (КИББ КазНЦ РАН).

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
заведующий лабораторией
КИББ КазНЦ РАН, г. Казань
Юрий Федорович Зуев

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Московского государственного университета им.
М.В. Ломоносова, г. Москва
Владимир Израилевич Муронец

доктор химических наук, профессор
Мурманского государственного технического
университета, г. Мурманск
Светлана Ростиславовна Деркач

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное
учреждение высшего образования
«Казанский (Приволжский) федеральный
университет», г. Казань

Защита состоится « 20 » октября 2016 в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при ФГБУН КИББ КазНЦ РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я № 30, тел/факс (843)2927347, e-mail: dissovet@kibb.knc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Казанского научного центра РАН и на официальном сайте КИББ КазНЦ РАН <http://www.kibb.knc.ru>

Автореферат разослан « » 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Анастасия Анатольевна Пономарева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. 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).

Большинстве 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; Papikka 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 и задачи исследования. Целью работы является 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.

Научная новизна работы. Получены данные о влиянии широкого спектра амфифильных веществ различного строения на структуру и каталитическую активность трипсина и α -химотрипсина. Впервые охарактеризована солубилизирующая 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 за счет изменений в структуре 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 биомолекул, 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 исследование. 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 «Межмолекулярное распознавание и внутримолекулярная передача сигнала в функциональных комплексах белок-лиганд» (номер госрегистрации №0120.0 1357054), 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 протейолитических 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.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Материалы. В работе использовали сериновые протеазы: трипсин (КФ 3.4.21.4) и α -химотрипсин (КФ 3.4.21.1) производства (Sigma, США), субстраты - N- α -бензоил-L-аргинин этиловый эфир (ЭЭБА) и N-бензоил DL-аргинин p-нитроанилид (БАПНА) для трипсина, N-бензоил L-тирозин p-нитроанилид (БТНА) для α -химотрипсина производства (Sigma, США). В работе использовали буферный раствор (50 мМ трис-HCl) при pH 7.5 (pH 8.5 - для мицеллярных растворов АОТ и ЦТАБ).

Амфифильные соединения:

- алкиламмонийные геминальные поверхностно-активные вещества (ГПАВ) – с метильным заместителем в головной группе $[C_nH_{2n+1}(CH_3)_2N(CH_2)_6N(CH_3)_2C_nH_{2n+1}]^{2+}Br^{2-}$ различающиеся длиной алкильного радикала n- C_nH_{2n+1} ; где n = 10, 12, 14, 16 (в тексте обозначаются как n=10, 12 и т.д.) и с гидроксипропиловым заместителем в головной группе $[C_{16}H_{33}(CH_3)(C_2H_4OH)N(CH_2)_mN(CH_3)(C_2H_4OH)C_{16}H_{33}]^{2+}Br^{2-}$ различающиеся длиной полиметиленового спейсера n- $(CH_2)_m$, где m = 6, 8, 10, 12 (в тексте обозначаются как m= 6, 8 и т.д.) синтезированы в ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН;

- коммерческие препараты ПАВ: анионный бис(2-этилгексил) сульфосукцинат натрия (АОТ) (MP Biomedicals, Германия), катионный бромид цетилтриметиламмония (ЦТАБ) (Sigma, США) В работе использовались микроэмульсии ПАВ/декан/вода/соПАВ. В качестве со-ПАВ использовали спирты нормального строения: n-бутанол, n-пентанол, n-гексанол, n-октанол «Реахим». Размер водных ядер обращенных мицелл характеризуется молярным отношением вода/ПАВ (W_0), а содержание со-ПАВ молярным отношением со-ПАВ/ПАВ (σ);

- алкилрезорцины C7 (4-метилрезорцин), C12 (4-гексилрезорцин) и C18 (додецилрезорцин) (Sigma, США).

1.2. Кинетические измерения. Кинетику ферментативных реакций регистрировали на спектрофотометре Lambda 25 (Perkin Elmer, США) с термостатируемым кюветным отделением. Реакцию инициировали введением субстрата. Если не указано иное, концентрация трипсина и α -химотрипсина в реакционной смеси составила 1.1 мкМ, концентрация субстратов - 1 мМ. За скоростью гидролиза ЭЭБА следили по изменению оптической плотности при 253 нм и 390 нм при гидролизе БАПНА и БТНА, соответственно.

1.3. Флуоресценция. Спектры флуоресценции триптофановых остатков белков записывали на спектрофлуориметре Флюорат-02-Панорама (ЛЮМЕКС, Россия) в диапазоне 310-400 нм при длине волны возбуждения 295 нм. Концентрация трипсина и α -химотрипсина в образцах составила 20 мкМ.

1.4. Динамическое светорассеяние. Эксперименты проводили на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Растворы предварительно отфильтровывали и термостатировали при заданной температуре в течение 10 минут.

1.5. Определение коэффициентов самодиффузии. Измерения коэффициентов самодиффузии (КСД) выполнены на спектрометре ЯМР AVANCE III (Bruker, Германия) с датчиком TХI 5мм, оснащенный градиентной катушкой. Для измерения КСД использована импульсная последовательность «стимулированное эхо» с биполярными градиентами. Измерения КСД проведены на ядрах протонов ^1H (600.13 МГц). Градиент магнитного поля в экспериментах изменяли в интервале от 0 до 0.5 Тл·м⁻¹ при постоянном времени диффузии и длительности импульсов градиента магнитного поля.

1.6. Молекулярный докинг. Анализ вероятности образования комплексов белок-лиганд выполнен методом молекулярного докинга с использованием компьютерной программы «Autodock 4.2». 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 белков была взята из Protein Data Bank.

1.7. ИК-спектроскопия. Метод ИК-спектроскопии применялся для контроля структурных изменений белков под действием амфифильных лигандов. Для снятия ИК-спектров проводили обмен доступных протонов в трипсине, α -химотрипсине и лигандах на дейтероны. Спектры ИК регистрировали на спектрофотометре Tensor 27 (Bruker, Германия), спектральное разрешение 4 см⁻¹, 128 сканов.

1.8. Исследование солиubilизационной емкости ассоциатов ПАВ. В качестве зонда использовали специфические субстраты (БТНА, БАПНА). Солиubilизационную емкость растворов ГПАВ определяли как отношение растворимости субстратов в растворе ГПАВ к его растворимости в воде.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Структура и активность сериновых протеаз в микроэмульсионных средах

Для изучения влияния структуры микроэмульсионной среды на каталитическую активность трипсина и α -химотрипсина, иммобилизованных в водных ядрах обращенных мицелл, в качестве со-ПАВ использовали спирты нормального строения С4, С5, С6 и С8. Кинетические исследования показали, что в буферном растворе при повышении концентрации н-бутанола происходит увеличение начальной скорости реакции гидролиза ЭЭБА и БАПНА, а затем наблюдается резкий спад активности фермента (рис. 1А, 1Б).

В системах на основе АОТ и ЦТАБ профиль зависимости активности трипсина от содержания н-бутанола имеет другую форму (рис. 1В). При повышении концентрации спирта в АОТ и ЦТАБ наблюдается снижение начальной скорости гидролиза ЭЭБА (рис. 1В).

Следует также отметить, что микроэмульсии на основе анионного АОТ формируются и в отсутствие спирта, а системы на основе катионного ЦТАБ формируются только при определенном содержании н-бутанола. Абсолютные значения скорости реакции ниже в обращенных мицеллах АОТ, что может быть следствием уменьшения концентрации катионного субстрата в зоне реакции за счет его электростатического «заякоривания» на межфазной поверхности раздела, сформированной анионным ПАВ (Stupishina et al., 2001).

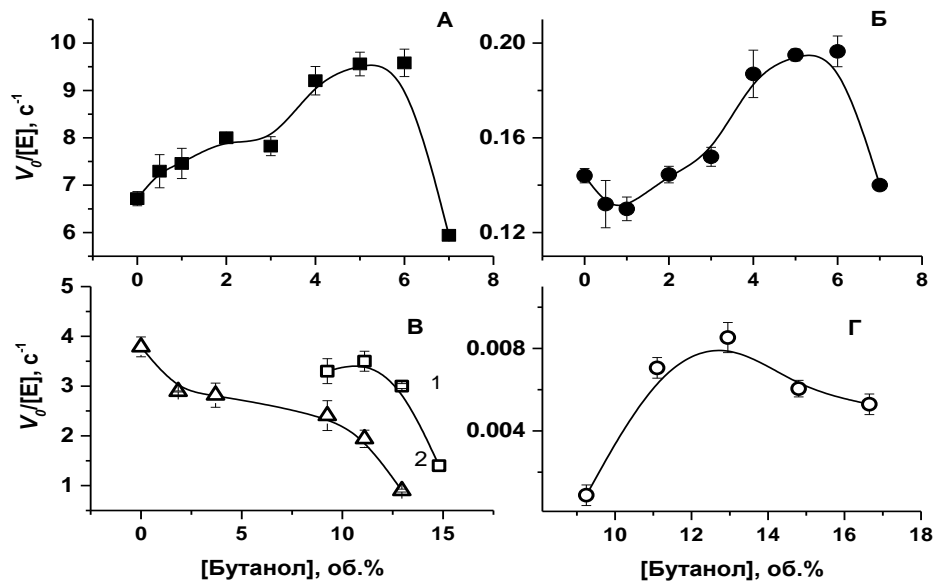


Рис. 1. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза ЭЭБА и БАПНА в буфере (А, Б) (50 мМ трис-НСl, рН-8.5), ЭЭБА в ЦТАБ(1) и АОТ (2) (В), БАПНА в ЦТАБ (Г) от концентрации н-бутанола (23°C, $C_{миц}=0.1M$, $W_0=20$).

В случае гидролиза нитроанилидного субстрата БАПНА реакция не фиксируется, как в отсутствие, так и в присутствии н-бутанола. В катионном ЦТАБ с БАПНА, кинетическая картина существенно меняется. При повышении концентрации спирта наблюдается увеличение начальной скорости гидролиза БАПНА, а затем уменьшение активности трипсина (рис. 1Г). Одной из причин сложной зависимости

активности фермента от концентрации спирта в мицеллярных системах может быть нестабильность его вторичной и третичной структуры.

По данным ИК-спектроскопии существенные изменения вторичной структуры белка в области поглощения β -структуры (1633 см^{-1}) по сравнению с буферным раствором наблюдаются уже в базовой (без спирта) мицеллярной системе АОТ. При добавлении спирта доля нативной β -структуры в белке снижается еще больше (рис. 2). Нарушение вторичной структуры фермента может быть следствием как непосредственного связывания спирта белком, так и изменений в структуре самой воды под действием спирта, на что указывает высокочастотный сдвиг полосы $\delta\text{ОН}$ (1643 до 1652 см^{-1}) воды (спектры не приводятся).

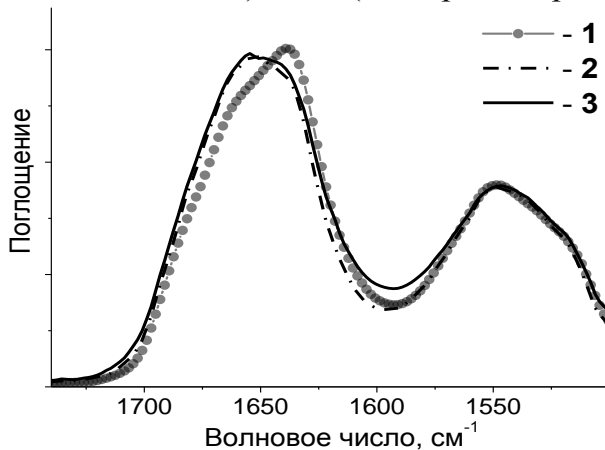


Рис. 2. ИК-Спектры поглощения трипсина в различных средах: буфер (1), АОТ (2), АОТ/бутанол (3). Спектры нормированы по максимуму полосы амид I ($\sigma=0.5$).

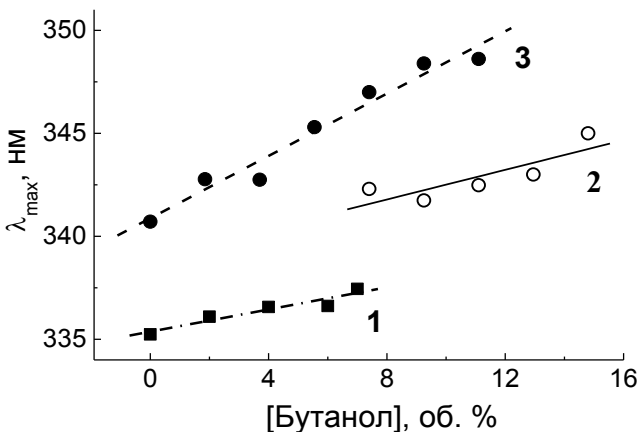


Рис. 3. Зависимость максимума триптофановой флуоресценции для трипсина от концентрации н-бутанола в буферном растворе (1) и в ЦТАБ (2) и АОТ (3).

компонент системы позволили определить распределение воды и спирта между мицеллами и органической дисперсионной средой. Согласно данным ЯМР (данные не приведены) присутствие спирта вызывает уменьшение размера мицелл и увеличение

Для оценки влияния н-бутанола на третичную структуру трипсина исследовали спектры триптофановой флуоресценции белков. При увеличении концентрации н-бутанола для трипсина значение максимума флуоресценции сдвигается в область больших длин волн, что свидетельствует о денатурационных изменениях белковой молекулы (рис. 3) (Zuev et al., 2004).

В системе на основе ЦТАБ, при высоких концентрациях н-бутанола (7-15 об.%) степень разворачивания трипсина существенно меньше, чем для АОТ. Возможно, этим отчасти объясняются более высокие значения скорости гидролиза ЭЭБА в мицеллах ЦТАБ по сравнению с АОТ при высоком содержании спирта (рис. 1В).

С другой стороны, на активность фермента может влиять перераспределение субстрата между фазами по мере роста содержания полярного компонента, каковым является спирт.

Коэффициенты самодиффузии компонент системы позволили определить распределение воды и спирта между мицеллами и органической дисперсионной средой. Согласно данным ЯМР (данные не приведены) присутствие спирта вызывает уменьшение размера мицелл и увеличение

полярности дисперсионной среды. В отсутствие 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. Диффузионные данные для системы с н-бутанолом показывают уменьшение радиуса мицелл до 3.3 нм. Поскольку солюбилизирующая емкость мицелл по отношению к спирту ограничена и при увеличении концентрации спирта в системе возрастает его количество в дисперсионной среде, со спиртом туда проникает и вода. Для обращенных мицелл на основе ЦТАБ количество н-бутанола, входящего в состав мицелл, не превышает 15 % от его общего содержания в системе, в то время как обращенные мицеллы образованные АОТ имеют значительно более высокую солюбилизационную емкость по отношению к н-бутанолу (рис. 4).

Увеличение полярности органической дисперсионной фазы микроэмульсии изменяет распределение субстрата между фазами системы. Происходит увеличение содержания спирта в водных ядрах мицелл и повышение его концентрации в зоне реакции. В то же время имеет место увеличение растворимости ЭЭБА в органической среде при росте количества н-бутанола в ней (рис.5), что приводит к падению концентрации субстрата в водной фазе и уменьшению доступности его для фермента.

В случае гидролитического расщепления БТНА α -химотрипсином наблюдается сходная с трипсином картина ингибирования реакции.

Таким образом, при использовании микрогетерогенных систем в качестве среды для неводного катализа необходимо учитывать распределение компонент этих систем между различными фазами. Установлено, что присутствие нормальных алифатических спиртов в микроэмульсионной среде вызывает уменьшение каталитической активности фермента по сравнению с базовой микроэмульсией. Это связано с уменьшением размеров мицеллярных агрегатов, усилением влияния зарядов поверхности раздела

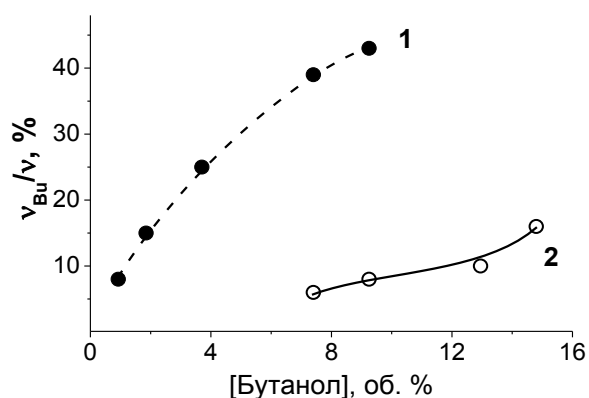


Рис. 4. Зависимость относительной доли н-бутанола, солюбилизированного обращенными мицеллами, от общего содержания н-бутанола в системе обращенных мицелл: АОТ(1) и ЦТАБ(2).

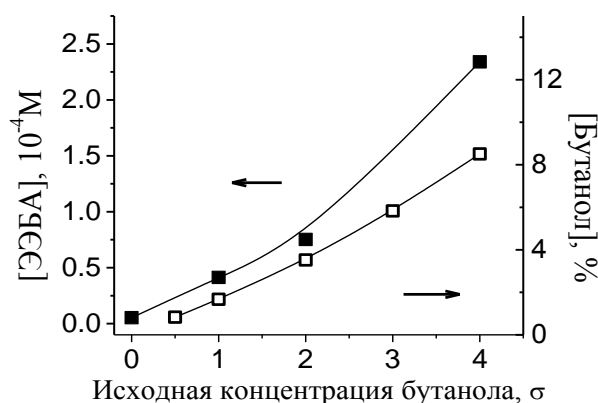


Рис. 5. Изменение концентрации субстрата и н-бутанола в дисперсионной среде АОТ.

фаз (головных групп ПАВ) и модификацией структуры фермента под действием изменяющихся свойств водной среды.

2.2. Структура и свойства сериновых протеаз в водных растворах ГПАВ

Строение ПАВ определяет особенности образованных ими мицеллярных агрегатов (Миргородская и др., 2010). Димерные или геминальные ПАВ состоят из двух заряженных головных групп, ковалентно соединённых углеводородным спейсерным фрагментом. ГПАВ используемые в данной работе можно разделить на две группы в учетом особенностей их строения: 1 - ГПАВ с гексаметиленовым спейсерным фрагментом, различающиеся длиной алкильного радикала; 2 – гидроксилсодержащие ГПАВ, различающиеся длиной полиметиленового спейсера.

Свойства растворов ГПАВ как среды для ферментативных реакций. Использованные субстраты (БТНА и БАПНА) - гидрофобные соединения. Данные (Миргородская и др., 2010) по критической концентрации мицеллообразования (ККМ) показывают, что при концентрациях, использованных в работе, ГПАВ с n=10 и 12 находятся, в молекулярной форме, а ГПАВ с n=14, 16 и m=6, 8, 10, 12 – в мицеллярной форме.

Согласно данным по динамическому светорассеянию (данные не приведены) ГПАВ в водном растворе существуют в виде ассоциатов или мицелл, размеры которых уменьшаются с ростом длины спейсерного фрагмента и с уменьшением длины алкильного радикала. При этом средний гидродинамический диаметр комплексов ГПАВ-белок на 15-25% превышает размер мицелл и до полутора раз размер молекулы белка.

Солюбилизацию БТНА и БАПНА растворами ГПАВ оценивали при помощи коэффициента распределения субстратов между мицеллярной и водной фазами (P):

$$P = \frac{S_{общ} - S_w}{S_w} \quad (1),$$

Таблица 1. Солюбилизация БТНА и БАПНА в водных растворах ГПАВ ($C_{ПАВ}=1\text{мМ}$, 23°C)

где $S_{общ}$ – общая растворимость солюбилизируемого вещества, S_w – его растворимость в воде. В таблице 1 представлены данные по солюбилизации БТНА и БАПНА в исследуемых системах. Растворы ГПАВ с гидроксипропиловым заместителем с субстратом БТНА характеризуются самым высоким коэффициентом распределения (P). Наблюдается хорошая растворимость БТНА с гидроксилсодержащими ГПАВ и с ГПАВ n=16. Происходит концентрирование БТНА вследствие его солюбилизации. Растворимость БАПНА в растворах ГПАВ существенно ниже. Наименьшая

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

растворимость наблюдается в среде немицеллизованных ГПАВ (n=10, 12). Изменение растворимости субстратов в растворах ПАВ должны находят отражение в реакционной способности исследуемых белков.

Структура и каталитическая активность трипсина и α -химотрипсина в растворах ГПАВ с метильными заместителями в головных группах. Влияние ГПАВ с метильными заместителями на каталитическую активность трипсина и α -химотрипсина различается. В растворах трипсина ГПАВ оказывают лишь небольшое ингибирующее действие, которое не зависит от длины алкильного

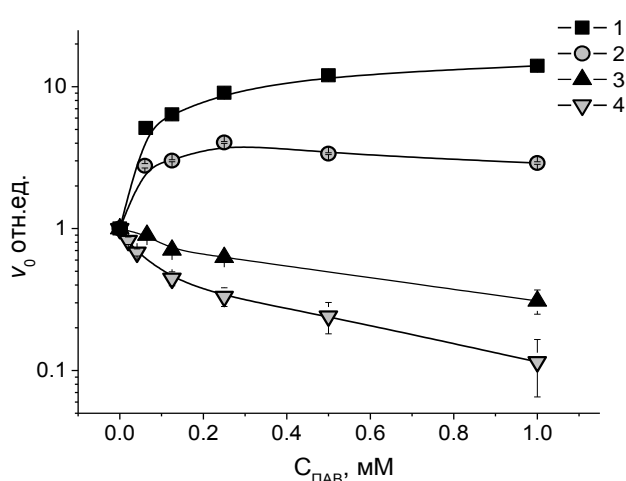


Рис. 6. Зависимость относительной начальной скорости реакции гидролиза БТНА в присутствии α -химотрипсина от концентрации ГПАВ; n=10 (1); 12 (2); 14 (3); 16 (4). v_0 в буферном растворе 0.07 мкМ/с (23°C).

радикала (табл.2). Влияние ГПАВ на α -химотрипсин более выражено, а удлинение алкильной цепи приводит к качественно различным эффектам: от активации при n=10 и 12 до ингибирования при n=14 и выше (рис.6 и табл.2).

Константа Михаэлиса (K_M), характеризующая сродство фермента к субстрату, в случае трипсина незначительно варьирует в присутствии ГПАВ с различными n. В то же время, для α -химотрипсина по сравнению с контролем (буферный раствор) наблюдается заметное уменьшение (для n=10) или увеличение (для n=16) константы Михаэлиса, что существенно сказывается на эффективности катализа.

наблюдается заметное уменьшение (для n=10) или увеличение (для n=16) константы Михаэлиса, что существенно сказывается на эффективности катализа.

Таблица 2. 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 ($C_{\text{ХТ}}=1$ мкМ, $C_{\text{ТР}}=1.7$ мкМ, $C_{\text{ПАВ}}=1$ мМ)

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)	0.031	0.85	0.031	365
α -химотрипсин +ГПАВ(n=10)	3.3	0.4	3.3	82500

Зависимость конформации белков от присутствия ГПАВ в растворе исследовали с помощью триптофановой флуоресценции. В состав молекул трипсина и α -химотрипсина входят 4 и 8 остатков триптофана, соответственно. Характер влияния ГПАВ на интенсивность флуоресценции как трипсина, так и α -химотрипсина зависит от длины алкильного остатка (в качестве примера на рис. 7 приведены данные

для α -химотрипсина). ГПАВ с $n=10$ вызывает тушение флуоресценции во всем диапазоне исследованных концентраций, не влияя на положение максимума по длине волны. Однако ГПАВ с более длинными алкильными цепями вызывают рост интенсивности флуоресценции белков и сдвиг максимума в область более высоких длин волн.

Увеличение интенсивности флуоресценции может быть обусловлено удалением соседних групп-тушителей от хромофора за счет изменения конформации остатков, при этом длинноволновый сдвиг свидетельствует об одновременном увеличении доступности хромофоров воде. В водных растворах белков одновременный рост интенсивности и длины волны флуоресценции связывают с денатурацией фермента (Решетняк, 1997). В случае α -химотрипсина зависимость начальной скорости реакции от концентрации и структуры ГПАВ демонстрирует обратную корреляцию с интенсивностью флуоресценции. Таким образом, замедление реакции может объясняться денатурацией части молекул фермента. В то же время, рост активности, наблюдаемый при неизменности конформации фермента, должен иметь иные причины.

Данные ИК-спектроскопии свидетельствуют о том, что качественно изменения в спектрах трипсина и α -химотрипсина под действием ГПАВ схожи и проявляются в высокочастотном сдвиге положения максимума полосы амид I и ее уширению по мере увеличения длины алкильной цепи. Сильнее всего выражены эти изменения в спектрах α -химотрипсина (рис. 8А), что сопровождается также заметным ростом поглощения на частоте концевых COO^- групп (рис. 8Б).

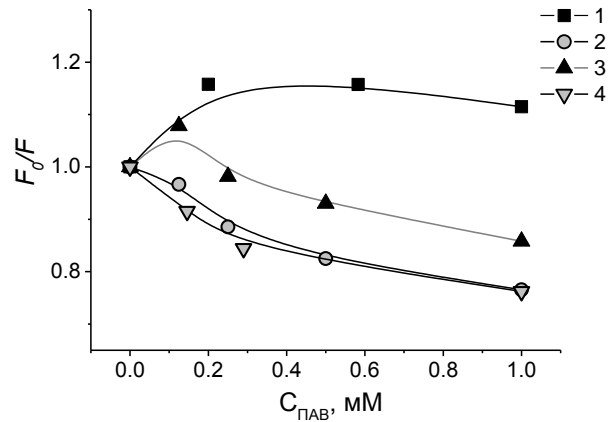


Рис. 7. Зависимость интенсивности триптофановой флуоресценции химотрипсина от концентрации ГПАВ: $n=10$ (1); 12 (2); 14 (3); 16 (4). F_0 - интенсивность триптофановой флуоресценции в буфере, F - в ГПАВ.

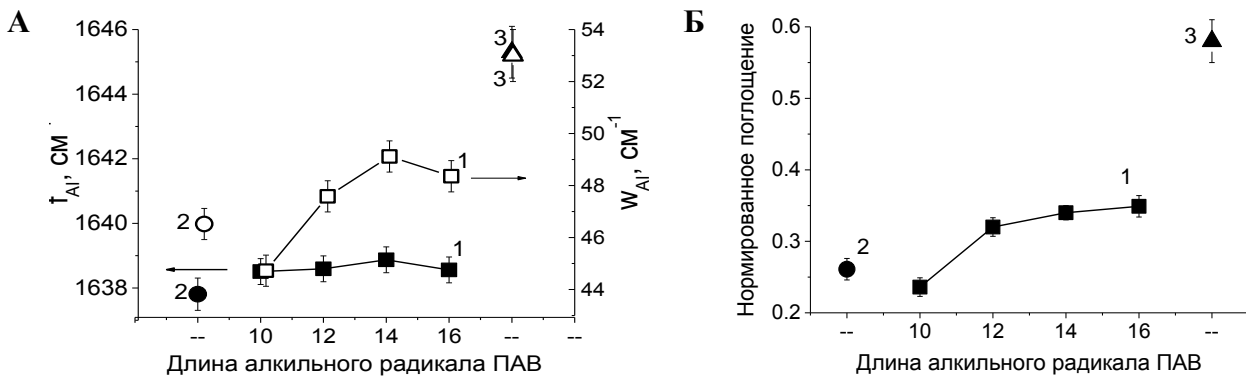


Рис. 8. А. Зависимость частоты максимума (темные символы, левая шкала) и ширины на полувысоте (светлые символы, правая шкала) полосы амид I α -химотрипсина от длины алкильного радикала ГПАВ(1), в буферном растворе(2), денатурированного автолизом(3). Б. Зависимость нормированной интенсивности поглощения концевых ионизированных карбоксилатов белка от длины алкильного радикала ГПАВ(1) в буферном растворе(2), денатурированного автолизом(3) ($C_{\text{ГПАВ}}=4\text{ мМ}$).

Анализ спектров по второй производной показал, что высокочастотный сдвиг максимума амид I обусловлен переходом части нативной β -структуры α -химотрипсина (компонента 1636 см^{-1}) в неупорядоченную структуру ($1640\text{--}46\text{ см}^{-1}$) (Celej et al., 2004).

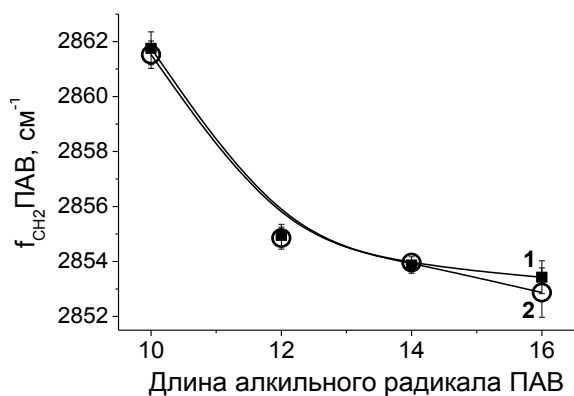


Рис. 9. Соотношение между положением максимума симметричного валентного колебания CH_2 -групп в ИК-спектрах ГПАВ и длиной алкильного радикала соответствующего ПАВ в растворе (1), в присутствии белка (2). ($C_{\text{ПАВ}}=4\text{ мМ}$)

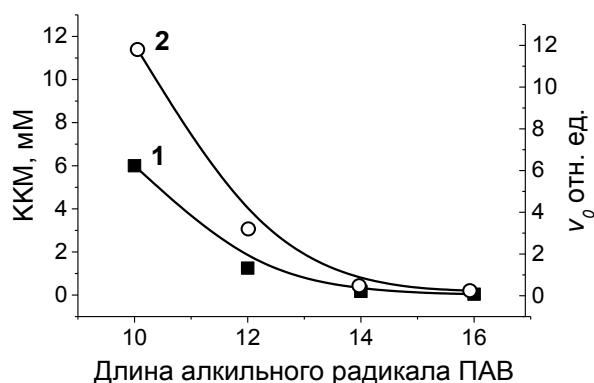


Рис. 10. Изменение ККМ геминальных ПАВ (1) и относительной начальной скорости реакции ($C_{\text{ПАВ}}=0.5\text{ мМ}$) (2) в зависимости от длины алкильного радикала.

Состояние ГПАВ в растворе можно оценить по положению максимума поглощения CH_2 -групп. Понижение частоты CH_2 групп геминальных ПАВ с ростом длины алкильного радикала указывает на переход из мономерного в мицеллярное состояние (рис. 9), свидетельствуя о соответствующем увеличении гидрофобности мицелл.

Увеличение количества групп CH_2 в углеводородных радикалах приводит к резкому уменьшению ККМ и к падению активности фермента (рис. 10). Между обеими величинами наблюдается пропорциональная зависимость, из чего можно сделать вывод, что мицеллизация влияет на активность фермента.

Исключение составляет система α -химотрипсин-ГПАВ ($n=10$), где по сравнению с контролем (буферный раствор) наблюдается некоторое сужение полосы амид I, что обусловлено снижением поглощения неупорядоченной структуры (1648 см^{-1}) и β -структуры (1615 см^{-1}) с одновременным усилением спиральной компоненты (1654 см^{-1}). Сравнение зависимостей (рис. 8А, 8Б), показывает, что высокочастотный сдвиг полосы амид I и ее уширение коррелируют с интенсивностью поглощения концевых карбоксилов, что можно объяснить, как проявление процесса автолиза фермента. Описанные выше изменения в спектрах α -химотрипсина в присутствии ГПАВ характерны для более развернутой структуры, которая, в свою очередь более подвержена автолизу. Денатурационные проявления усиливаются при увеличении длины алкильных радикалов ГПАВ от 10 до 16 метиленовых групп, что может быть обусловлено различиями во взаимодействии ГПАВ с ферментом.

Таким образом, ГПАВ в мономерной форме могут взаимодействовать с α -химотрипсином, индуцируя изменения, которые усиливают каталитическую активность фермента. В то же время, в присутствии мицеллизованного ПАВ происходит перераспределение субстрата между объемной и мицеллярной фазами раствора, что сказывается на снижении скорости гидролиза субстратов.

Структура и каталитическая активность трипсина и α -химотрипсина в растворах гидроксилсодержащих ГПАВ.

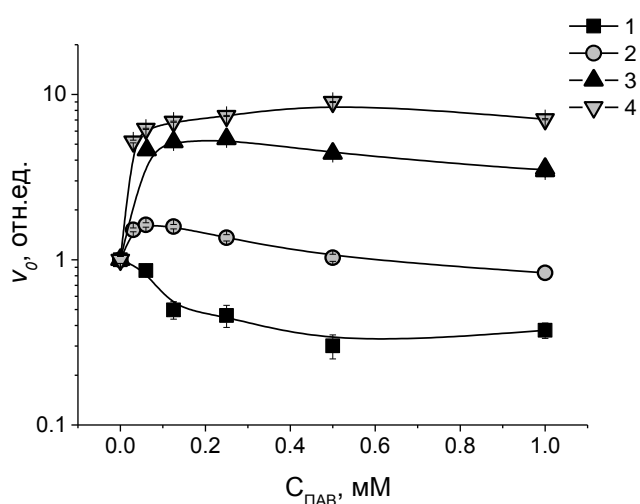


Рис. 11. Зависимость относительной начальной скорости реакции гидролиза БТНА в присутствии α -химотрипсина от концентрации ГПАВ: $m=6$ (1); 8 (2); 10 (3); 12 (4). v_0 в буферном растворе 0.07 мкМ/с.

короткими спейсерными фрагментами ее замедление. Значения K_M практически не изменяются (таблица 3) в мицеллярных системах по сравнению с буферным раствором. В то же время по сравнению с контролем (буферный раствор) наблюдается существенное уменьшение ($m=6$) или увеличение ($m=10$) эффективности катализа. В случае трипсина присутствие ГПАВ приводит к уменьшению каталитической активности фермента по сравнению с буферным раствором.

Исследовано влияние гидроксилсодержащих ГПАВ с различной длиной полиметиленового спейсера, на структуру и каталитическую активность трипсина и α -химотрипсина. В присутствии всего ряда ГПАВ происходит изменение каталитической активности трипсина и α -химотрипсина (рис. 11, данные приведены на примере α -химотрипсина). Наблюдается корреляция между активностью α -химотрипсина и длиной спейсерного фрагмента ГПАВ. 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 ГПАВ с более

Таблица 3. 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 ($C_{\text{ХТ}} = 1 \text{ мкМ}$, $C_{\text{ТР}} = 1.8 \text{ мкМ}$, $C_{\text{ПАВ}} = 1 \text{ мМ}$)

Система	$V_m, \text{ мкМ/с}$	$K_M 10^{-4}, \text{ М}$	$k_{cat}, \text{ с}^{-1}$	$k_{cat}/K_M, \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$
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

Данные по триптофановой флуоресценции (данные не приведены) демонстрируют, что с увеличением концентрации ГПАВ происходит рост интенсивности флуоресценции ферментов примерно в равной мере для всех исследованных соединений. Одновременно наблюдается сдвиг максимума флуоресценции в область более высоких длин волн. Сравнение ИК-спектров 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}).

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}). Одновременно происходит увеличение числа концевых COO^- групп, что проявляется в росте интенсивности поглощения (1590 см^{-1}). Сравнение спектров поглощения α -химотрипсина в присутствии ГПАВ со спектром денатурированного белка показывает качественное сходство наблюдаемых изменений, хотя денатурирующее действие ГПАВ сравнительно невелико. Таким образом, изменение эффективности катализа (k_{cat}/K_M) может быть вызвано изменением в структуре фермента при взаимодействии с ГПАВ.

На рисунке 12 сопоставлены изменения начальной скорости реакции, катализируемой α -химотрипсином, с коэффициентом распределения БТНА между мицеллярной и водной фазами растворов ПАВ.

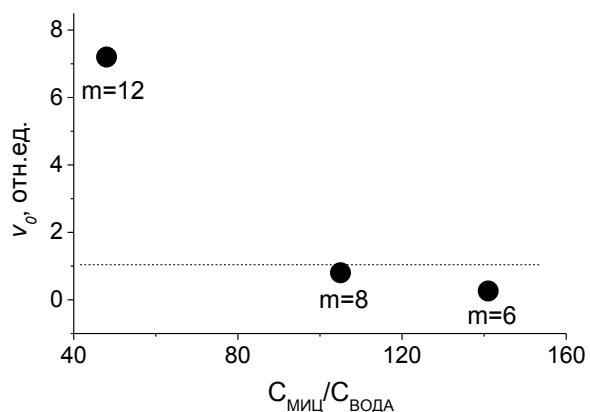


Рис. 12. Зависимость скорости гидролиза БТНА в системе α -химотрипсин/ГПАВ относительно буферного раствора от коэффициента распределения субстрата между мицеллярной и водной фазами ПАВ ($C_{ПАВ}=1\text{ мМ}$).

Если для систем ГПАВ 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 ГПАВ с $m=12$ имеет место повышение скорости реакции относительно буфера. Из приведенной зависимости следует, что с уменьшением длины спейсера в ряду изученных ГПАВ резко уменьшается концентрация субстрата в водной фазе системы, что, очевидно, является основным фактором, приводящим к уменьшению активности α -химотрипсина. Таким образом, активность α -химотрипсина при добавлении ГПАВ(ОН) зависит от длины спейсерного фрагмента. Происходит рост активности при добавлении ГПАВ с большими спейсерными фрагментами, тогда как с остальными наблюдается ее уменьшение.

Анализ комплексообразования мономеров ГПАВ с трипсином и α -химотрипсином методом молекулярного докинга. Для объяснения наблюдаемых эффектов проведен анализ вероятности комплексообразования ГПАВ с различными аминокислотными остатками белков. Показано, что все исследованные соединения образуют энергетически выгодные комплексы с трипсином и α -химотрипсином, однако трипсин образует более устойчивые комплексы с мономерами ПАВ, чем α -химотрипсин (рис. 13, табл. 4).

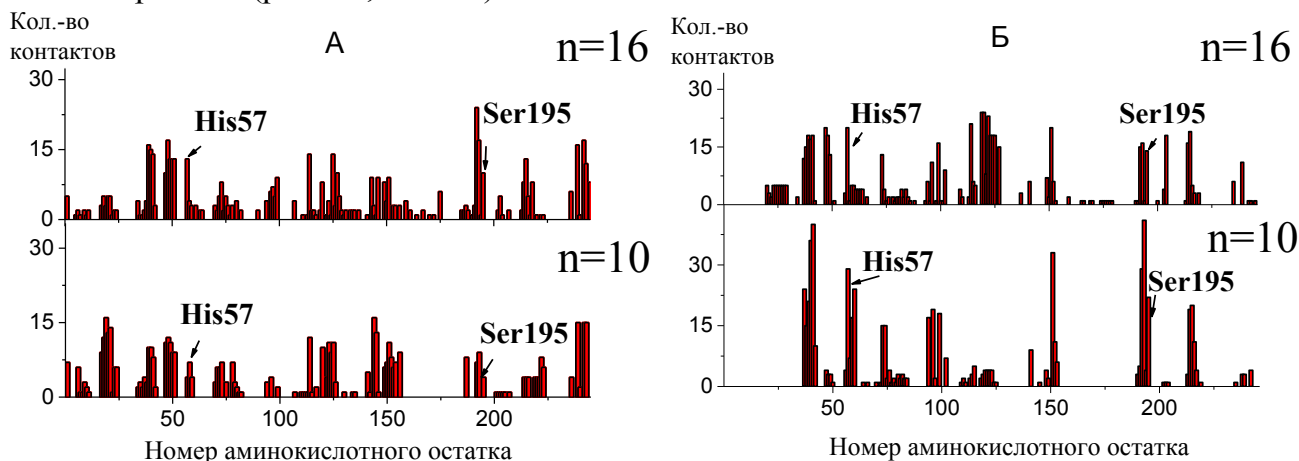


Рис. 13. Количество контактов образованных аминокислотными остатками α -химотрипсина (А) и трипсина (Б) с ГПАВ $n=10$ и $n=16$.

Для α -химотрипсина характерно более равномерное распределение молекул ПАВ по поверхности белка, включая контакты с аминокислотными остатками активного центра His57 и Ser195. Для трипсина, наблюдается более неравномерное распределение молекул ПАВ по поверхности белка. При этом высока вероятность локализации ГПАВ в районе активного центра трипсина и α -химотрипсина (рис. 14).

Таблица 4. Энергия взаимодействия ПАВ с α -химотрипсином и трипсином

Тип комплекса	Средняя энергия Ккал/моль
α -химотрипсин-ГПАВ($n=16$)	-8.4 ± 1.2
α -химотрипсин-ГПАВ($n=10$)	-7.7 ± 1.1
α -химотрипсин-ГПАВ($m=6$)	-4.6 ± 1.5
α -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

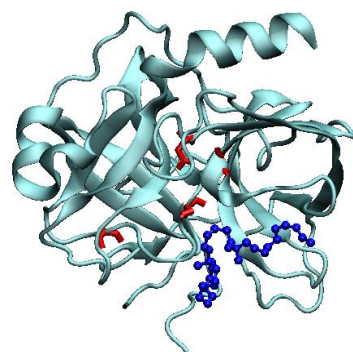


Рис. 14. Комплекс α -химотрипсина с ГПАВ ($n=10$) по данным молекулярного докинга.

Разница в энергии взаимодействия белков с ПАВ объясняется строением трипсина и α -химотрипсина. Фермент α -химотрипсин имеет большой положительный заряд. Меньшая энергия взаимодействия ПАВ с α -химотрипсином объясняется неблагоприятным электростатическим взаимодействием между положительно заряженными α -химотрипсином и ГПАВ.

Таким образом, установлены существенные различия в поведении белков при взаимодействии с различными по структуре ГПАВ. При взаимодействии α -химотрипсина с ГПАВ наблюдается изменение каталитической активности, имеющее противоположные векторы – в сторону ускорения или уменьшения. ГПАВ с метильными заместителями в головных группах в мономерной форме взаимодействуют с α -химотрипсином, тем самым усиливают его каталитическую активность. В мицеллярных растворах ГПАВ 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 ГПАВ 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 ГПАВ 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 сольубилизации субстратов растворами ГПАВ, которая во многом определяет доступность субстратов к активному центру ферментов.

2.3. Механизмы регуляции активности сериновых протеаз амфифильными алкилоксибензолами

Влияние амфифильных алкилоксибензолов на каталитическую активность и структуру трипсина и α -химотрипсина. Присутствие АОБ приводит к снижению каталитической активности ферментов для всего ряда алкилоксибензолов С7, С12 и С18. Соединения С12 и С18 обладают более выраженными амфифильными свойствами, в то время как С7 по своей природе более гидрофилен. 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. Следует отметить, что в присутствии АОБ в системе АОБ/трипсин происходит смещение температурного максимума в сторону более высоких температур, по сравнению с контролем (рис. 15А, 15Б).

Для определения влияния АОБ на структуру ферментов были исследованы спектры триптофановой флуоресценции белков. Разложение спектров флуоресценции спектры трипсина и α -химотрипсина на составляющие, относящиеся к различным группам триптофанов (Burstain et al, 2001) (табл. 5), показывает, что у обоих белков излучение коротковолновых компонент спектра (~330 нм) определяют Trp141 и 51, а длинноволновых компонент (~340 нм) – главным образом Trp215 и 237; в α -химотрипсине излучение остальных остатков в значительной степени тушится окружением.

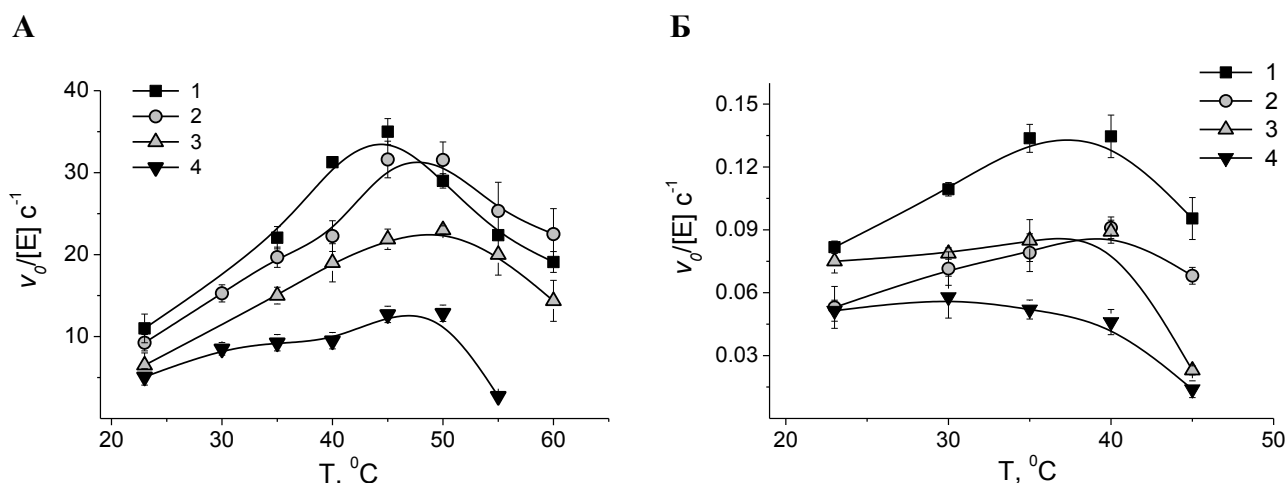


Рис. 15. Температурный профиль каталитической активности трипсина в присутствии АОБ (А): 1 – без АОБ, 2 – С7 (1мМ), 3 – С12 (1мМ), 4 – С18 (0.02мМ). Температурный профиль каталитической активности α -химотрипсина в присутствии АОБ (Б): 1 – без АОБ, 2 – С7 (0.5мМ), 3 – С12 (0.5мМ), 4 – С18 (0.02мМ) (23°C).

Изменение положения максимума пика в области 330 нм, соответствующего флуоресценции Trp51 и 141, практически недоступных воде, незначительно для трипсина и α -химотрипсина (табл. 5). 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. Наблюдается достаточно сильный «голубой» сдвиг флуоресценции этих флуорофоров, что может свидетельствовать о частичной дегидратации поверхности белка за счет «посадки» АОБ на его поверхность.

Таблица 5. Положение максимумов компонент (λ_{\max}^1 и λ_{\max}^2) флуоресценции остатков триптофана белков в буфере и в растворах АОБ

Фермент	АОБ	λ_{\max}^1	λ_{\max}^2
трипсин	контроль	328.6	340.1
	С7	327.9	339.3
	С12	330.3	340.7
	С18	327.8	340.1
α -химотрипсин	контроль	331.5	346.9
	С7	329.2	341
	С12	329.5	343
	С18	329.3	341.8

Анализ комплексообразования АОБ с трипсином и α -химотрипсином методом молекулярного докинга. Проанализированы следующие характеристики исследуемых систем: вероятность образования комплекса белков с молекулами АОБ (лиганд) и энергия взаимодействия в наиболее энергетически выгодных комплексах (табл. 6).

Анализ вероятности образования комплексов АОБ с различными аминокислотными остатками ферментов показал, что С7 в основном локализован в субстрат-связывающем кармане, а С12 и С18 более равномерно распределены по поверхности белков, по-видимому, из-за их больших геометрических размеров. В то же время, энергия взаимодействия С7 с трипсином и α -химотрипсином меньше, чем энергия взаимодействия с С12 и С18 (табл. 6).

Таблица 6. 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
α -химотрипсин	C7	-6.1 ± 0.5
	C12	-6.8 ± 1.5
	C18	-6.8 ± 2.6

Для всех изученных АОБ наблюдается повышение вероятности образования комплексов хотя бы с одним аминокислотным остатком каталитической триады трипсина или α -химотрипсина.

Таким образом, алкилоксибензолы в результате взаимодействия с макромолекулами трипсина и α -химотрипсина уменьшают их каталитическую активность, блокируя доступ субстрата к активному центру

фермента. Вследствие различий в локализации различных гомологов ряда АОБ на поверхности белка, изменения активности индивидуальны для каждого исследуемого соединения.

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. 16).

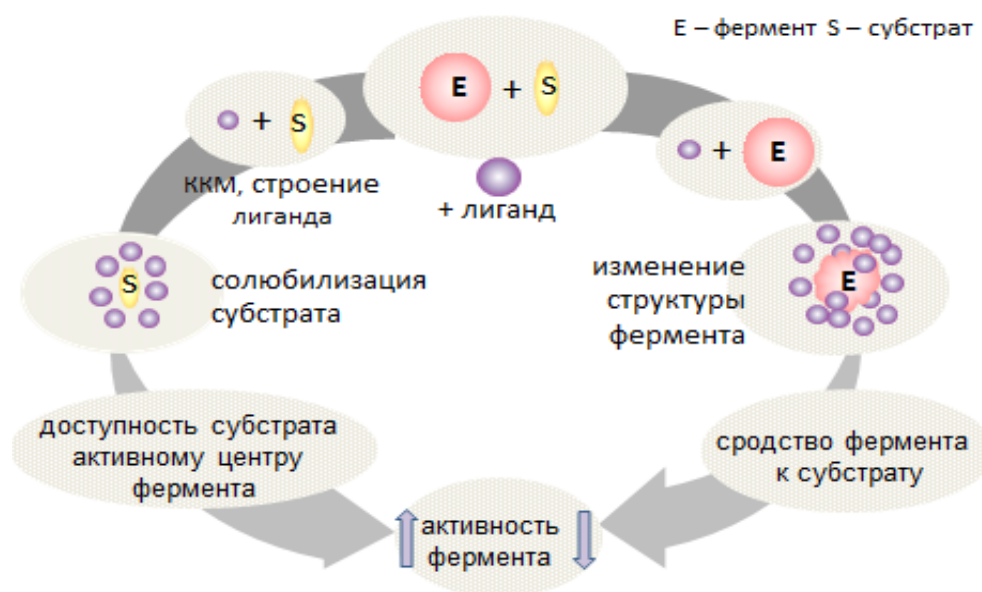


Рис. 16. Модель функционирования трипсина и α -химотрипсина в растворах амфифильных соединений.

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 солубилизационной 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 блокировка активного центра ферментов.

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. **Валиуллина Ю.А.** Влияние заряда межфазной поверхности на структуру и активность трипсина в обращенных мицеллах / Ю.А. Валиуллина, Е.А. Ступишина, Н.Н. Вылегжанина, Б.З. Идиятуллин, Ю.Ф. Зуев // Биоорганическая химия. – 2008. – Т.34, №3. - С. 399 - 403.

2. **Валиуллина Ю.А.** Молекулярные механизмы регуляции алкилоксибензолами активности сериновых протеаз / Ю.А. Валиуллина, Е.А. Ермакова, Н.Л. Захарченко, Ю.Ф. Зуев // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т. 35. – № 7. – С. 80 - 86.

3. **Валиуллина Ю.А.** Структура и каталитическая активность альфа-химотрипсина в растворах геминальных ПАВ / Ю.А. Валиуллина, Е.А. Ермакова, Д.А. Файзуллин, А.Б. Миргородская, Ю.Ф. Зуев // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2014. - № 1. - С. 273 - 279.

4. **Валиуллина Ю.А.** Структура и свойства комплексов альфа-химотрипсина с гидроксилсодержащими геминальными дикатионными ПАВ с варьируемой длиной спейсерного фрагмента / Ю.А. Валиуллина, Е.А. Ермакова, Д.А. Файзуллин, А.Б. Миргородская, Ю.Ф. Зуев // Журнал структурной химии. – 2014. – Т.55. – С. 376 - 383.

Статьи, опубликованные в других рецензируемых изданиях

5. Зуев Ю.Ф. Влияние нормальных алифатических спиртов на структуру и каталитические свойства мицеллярных нанореакторов / Ю.Ф. Зуев, Е.А. Ступишина, Д.А. Файзуллин, Б.З. Идиятуллин, **Ю.А. Валиуллина** // Структура и динамика молекулярных систем. – 2003. – № 10-2. – С. 57-59.

6. Зуев Ю.Ф. Влияние n-бутанола на микроструктуру мицеллярной системы вода/АОТ/декан. / Ю.Ф. Зуев, Н.Н. Вылегжанина, Б.З. Идиятуллин, **Ю.А. Валиуллина**, Е.А. Ступишина // Структура и динамика молекулярных систем. – 2004. – № 11-1. – С. 356-359.
7. **Валиуллина Ю.А.** Влияние структуры микроэмульсионной среды на каталитическую активность трипсина и α -химотрипсина / Ю.А. Валиуллина, Е.А. Ступишина, Б.З. Идиятуллин, Ю.Ф. Зуев // Структура и динамика молекулярных систем. – 2005. – № 12-1. – С. 96-99.
8. **Валиуллина Ю.А.** Влияние бутанола на структуру и активность трипсина, солюбилизованного в обращенных мицеллах на основе катионного и анионного ПАВ / Ю.А. Валиуллина, Е.А. Ступишина, Н.Н. Вылегжанина, Б.З. Идиятуллин, Ю.Ф. Зуев // Структура и динамика молекулярных систем. 2007. № 14-1. С. 58-61.
9. **Валиуллина Ю.А.** Влияние геминальных поверхностно-активных веществ на структурное состояние и активность альфа-химотрипсина / Ю.А. Валиуллина, Р.Х. Курбанов, А.Б. Миргородская, Ю.Ф. Зуев // Структура и динамика молекулярных систем. – 2010. – № 17-1. – С. 211-215.
10. **Валиуллина Ю.А.** Мицеллообразование и солюбилизация в растворах солей желчных кислот / Ю.А. Валиуллина, Л.Р. Богданова, Б.З. Идиятуллин, Ю.Ф. Зуев // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2014. – № 3. – С. 63-65.

Работы, опубликованные в материалах конференций

11. Зуев Ю.Ф. Влияние нормальных алифатических спиртов на структуру и каталитические свойства мицеллярных нанореакторов / Ю.Ф. Зуев, Е.А. Ступишина, Д.А. Файзуллин, Б.З. Идиятуллин, Н.Л. Захарченко, **Ю.А. Валиуллина** // Тезисы докладов X Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем». – Яльчик. – 2003. – С.116.
12. Zuev Yu.F. Effects of n-butanol and n-hexanol on the microstructure of water/AOT/n-decane system studied by ESR spin label and FT PGSE NMR methods / Yu.F. Zuev, N.N. Vylegzhana, B.Z. Idiyatullin, **Yu.A. Valiullina**, E.A. Stupishina // Abstracts of the international Conference “Modern development of magnetic resonance”. – Kazan. – 2004. – P. 313 -314.
13. Zuev Yu.F. Effects of n-butanol on the microstructure of water/AOT/n-decane system studied by FT PGSE NMR and ESR spin label methods / Yu.F. Zuev, **Yu.A. Valiullina**, N.N. Vylegzhana, B.Z. Idiyatullin // Abstracts of Third International Symposium “Molecular Design and Synthesis of Supramolecular Architectures”. – Kazan. – 2004. – P. 171.
14. **Валиуллина Ю.А.** // Структура и каталитическая активность трипсина в системе обратных мицелл в присутствии нормальных алифатических спиртов / Ю.А. Валиуллина, Е.А. Ступишина, Д.А. Файзуллин, Ю.Ф. Зуев // Тезисы докладов III Съезда биофизиков России. – Воронеж. – 2004. – Т.2. – С. 625-626.

15. Зуев Ю.Ф. Влияние н-бутанола на микроструктуру мицеллярной системы вода/АОТ/декан / Ю.Ф. Зуев, Н.Н. Вылегжанина, Б.З. Идиятуллин, **Ю.А. Валиуллина**, Е.А. Ступишина // Тезисы докладов XI Всероссийской конференции “Структура и динамика молекулярных систем”. – Яльчик. - 2004. – С. 112.
16. **Валиуллина Ю.А.** Влияние структуры микроэмульсионной среды на каталитическую активность трипсина и α -химотрипсина / Ю.А. Валиуллина, Е.А. Ступишина, Б.З. Идиятуллин, Р.Р. Нурмухаметов, Ю.Ф. Зуев // Тезисы докладов XII Всероссийской конференции “Структура и динамика молекулярных систем”. – Яльчик - 2005. – С. 34.
17. **Валиуллина Ю.А.** Влияние знака и величины заряда межфазной поверхности на структуру и активность трипсина / Ю.А. Валиуллина, Е.А. Ступишина, Н.Н. Вылегжанина, Б.З. Идиятуллин, Д.А. Файзуллин, Ю.Ф. Зуев // Тезисы докладов VI симпозиума «Химия протеолитических ферментов». – Москва. – 2007. – С. 104.
18. **Валиуллина Ю.А.** Влияние бутанола на структуру и активность трипсина, солюбилизованного в обращенных мицеллах на основе катионного и анионного ПАВ / Ю.А. Валиуллина, Н.Н. Ступишина, Н.Н. Вылегжанина, Б.З. Идиятуллин, Ю.Ф. Зуев // Тезисы докладов XIV Всероссийской конференции “Структура и динамика молекулярных систем”. – Яльчик. – 2007. – С. 52.
19. **Валиуллина Ю.А.** Модификация каталитической активности сериновых протеаз алкилоксибензолами / Ю.А. Валиуллина, Ю.В. Гоголев, Н.Е. Мухаметшина, Ю.Ф. Зуев // Тезисы докладов IV Российского симпозиума «Белки и Пептиды». – Казань. – 2009. – С. 246.
20. **Валиуллина Ю.А.** Влияние геминальных поверхностно-активных веществ на структурное состояние и активность альфа-химотрипсина / Ю.А. Валиуллина, Р.Х. Курбанов, А.Б. Миргородская, Ю.Ф. Зуев // Сборник тезисов XVII Всероссийской конференции “Структура и динамика молекулярных систем”. – Яльчик. – 2010. – С.36
21. **Валиуллина Ю.А.** Модификация структурного состояния и каталитической активности альфа-химотрипсина геминальными поверхностно-активными веществами / Ю.А. Валиуллина // Тезисы докладов Российской школы молодых ученых “Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии”. – Казань. – 2010. – С. 16.
22. Зуев Ю.Ф. Комплексы белков и нуклеиновых кислот с алкиламмонийными геминальными ПАВ / Ю.Ф. Зуев, **Ю.А. Валиуллина**, Н.Н. Вылегжанина, Д.А. Файзуллин, А.Б. Миргородская, М.А. Воронин, Л.Я. Захарова // Материалы научной сессии “Поверхностно-активные вещества в технологических процессах”. – Москва. – 2010. – С.74.
23. **Валиуллина Ю.А.** Модификация структурного состояния и каталитической активности сериновых протеаз геминальными поверхностно-активными веществами / Ю.А. Валиуллина, Д.А. Файзуллин, Е.А. Ермакова, Ю.Ф. Зуев // Тезисы докладов I

Всероссийского симпозиума по поверхностно-активным веществам “От коллоидных систем к нанохимии”. – Казань. – 2011. – С. 61.

24. **Валиуллина Ю.А.** Влияние геминальных поверхностно-активных веществ на структуру и активность сериновых протеаз / Ю.А. Валиуллина, Д.А. Файзуллин, Е.А. Ермакова, Ю.Ф. Зуев // Тезисы докладов III Международного симпозиума “Клеточная сигнализация у растений”. – Казань. – 2011. – С. 27 - 28.

25. **Валиуллина Ю.А.** Структура и активность трипсина в составе комплексов с геминальными поверхностно-активными веществами / Ю.А. Валиуллина, Д.А. Файзуллин, Е.А. Ермакова, Ю.Ф. Зуев // Тезисы докладов XVIII Всероссийской конференции “Структура и динамика молекулярных систем”. – Яльчик. – 2011. – С. 23.

26. **Валиуллина Ю.А.** Структурное состояние и каталитическая активность сериновых протеиназ в растворах геминальных поверхностно-активных веществ / Ю.А. Валиуллина, Д.А. Файзуллин, Е.А. Ермакова, Ю.Ф. Зуев // Тезисы докладов V Российского симпозиума “Белки и Пептиды”. – Петрозаводск. – 2011. – С. 362.

27. **Валиуллина Ю.А.** Влияние алкилоксибензолов на структуру и каталитическую активность сериновых протеаз / Ю.А. Валиуллина, Н.Л. Захарченко, Е.А. Ермакова, Ю.Ф. Зуев // Тезисы докладов IV съезда биофизиков России. – Нижний Новгород. – 2012. – Т.1. – С. 57.

28. **Валиуллина Ю.А.** Механизмы регуляции активности сериновых протеаз аутоиндукторами анабиоза / Ю.А. Валиуллина, Е.А. Ермакова, Н.Л. Захарченко, Ю.Ф. Зуев // Тезисы докладов VI Российского симпозиума «Белки и пептиды». – Уфа. – 2013. – С. 226.